

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, HOMBURG/SAAR

# Einfluss von Melatonin auf die Frakturheilung im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der  
Universität des Saarlandes  
2014

vorgelegt von Christina Anton,  
geb. am 21.06.1983 in Bonn

---

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Professor Dr. med T. Pohlemann

---

.

Dekan: Prof. Dr. med. M.D. Menger

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Jahr der Promotion: 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung/Summary</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenfassung . . . . .	1
1.2 Summary . . . . .	3
<b>2 Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1 Knochen . . . . .	5
2.1.1 Morphologie des Knochens . . . . .	5
2.1.2 Histologie des Knochens . . . . .	6
2.1.3 Physiologie des Knochens . . . . .	12
2.2 Frakturheilung . . . . .	14
2.2.1 Primäre Frakturheilung . . . . .	14
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung . . . . .	15
2.2.3 Wachstumsfaktoren . . . . .	18
2.2.4 Frakturmodelle . . . . .	19
2.3 Melatonin . . . . .	22
2.3.1 Historie . . . . .	22
2.3.2 Struktur und Synthese . . . . .	23
2.3.3 Wirkmechanismus . . . . .	24

2.3.4	Indikationen und Anwendungen von Melatonin . . . . .	26
2.3.5	Einfluss von Melatonin auf den Knochenmetabolismus . . . .	27
<b>3</b>	<b>Zielsetzung und Fragestellung</b>	<b>29</b>
3.1	Zielsetzung . . . . .	29
3.2	Fragestellung . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
4.1	Versuche . . . . .	31
4.1.1	Studienprotokoll . . . . .	31
4.1.2	Tiermodell . . . . .	33
4.1.3	Implantate . . . . .	33
4.1.4	Operation . . . . .	34
4.1.5	Medikamentenapplikation . . . . .	41
4.1.6	Tötung der Tiere . . . . .	41
4.1.7	Präparation der Knochen . . . . .	41
4.2	Auswertung . . . . .	42
4.2.1	Radiologische Analyse . . . . .	42
4.2.2	Biomechanische Analyse . . . . .	43
4.2.3	Histologische Analyse . . . . .	45
4.2.4	Western Blot -Analyse . . . . .	48
4.3	Statistische Analyse . . . . .	50
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
5.1	Radiologie . . . . .	51
5.2	Biomechanik . . . . .	53



5.3 Histologie . . . . .	55
5.4 Western Blot . . . . .	60
<b>6 Diskussion</b>	<b>63</b>
6.1 Diskussion der Methoden . . . . .	63
6.2 Diskussion der Ergebnisse . . . . .	66
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>Publikation</b>	<b>93</b>
<b>Danksagung</b>	<b>95</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>97</b>

# Kapitel 1

## Zusammenfassung/Summary

### 1.1 Zusammenfassung

Melatonin, das Haupthormon der Glandula pinealis, beeinflusst zahlreiche physiologische Prozesse des Körpers wie den zirkadianen Rhythmus, die Körpertemperatur, die Immunmodulation und die Alterung. Zudem konnte gezeigt werden, dass Melatonin durch Regulation der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität auch den Knochenmetabolismus beeinflusst. Die hemmende Wirkung von Melatonin auf die Osteoklastenaktivität wird durch die Beeinflussung der Balance von Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$  B Ligand (RANKL), Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$  B (RANK) und Osteoprotegerin (OPG) erklärt. Obwohl ein großes Interesse darin besteht, wie Melatonin die Knochenregeneration beeinflusst, wurde dessen Wirkung auf die Frakturheilung bisher nicht analysiert. In dieser Studie wurde deshalb untersucht, welchen Effekt die Behandlung mit Melatonin auf die Kallusbildung, den Remodelingprozess und die Expression von RANKL und OPG während der Frakturheilung hat.

Insgesamt wurden für diese Studie fünfzig CD-1 Mäuse im Alter von 12 - 14 Wochen untersucht. Fünfundzwanzig Tiere wurden täglich mit 50mg/kg Körpergewicht Melatonin behandelt. Die fünfundzwanzig Tiere der Kontrollgruppe erhielten die äquivalente Menge einer Ethanolösung. Die Frakturheilung wurde in einem geschlossenen Femurfrakturmodell der Maus radiologisch, biomechanisch, histomorphometrisch sowie proteinbiochemisch zwei und fünf Wochen postoperativ untersucht.

Die radiologischen Untersuchungen zeigten sowohl zwei Wochen als auch fünf Wochen postoperativ keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen ( $p > 0.05$ ). Die biomechanischen Untersuchungen zeigten, dass die Biegesteifigkeit zwei Wochen postoperativ nach Behandlung mit Melatonin signifikant geringer war im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch fünf Wochen postoperativ war die Biegesteifigkeit in der Melatoningruppe geringer, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.

Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass die Frakturen in beiden Gruppen über eine sekundäre Frakturheilung mit einer deutlichen Kallusbildung mit Anteilen einer enchondralen und intramembranösen Ossifikation geheilt sind. Zwei Wochen postoperativ unterschied sich die Kallusgröße in beiden Gruppen nicht. Fünf Wochen postoperativ war die Kallusgröße in den mit Melatonin behandelten Tieren signifikant größer als in der Kontrollgruppe, was für einen verzögerten Remodelingprozess spricht. Die Gewebearalyse des Frakturkallus zwei Wochen nach Fraktur zeigte nach Melatoninbehandlung einen geringeren Knochenanteil und einen höheren Anteil an Knorpelgewebe als in der Kontrollgruppe. Die Anzahl TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) -positiver Osteoklasten war nach Gabe von Melatonin signifikant geringer. Die meisten Osteoklasten konnten in der zentralen Region des Kallusgewebes nachgewiesen werden. Periostal und endostal fanden sich keine Osteoklasten. Die immunhistochemischen Färbungen konnten zudem zeigen, dass Osteoblasten fähig sind, einen Melatoninrezeptor zu exprimieren. Die Westernblot-Analysen zeigten zwei Wochen postoperativ, dass nach Gabe von Melatonin die Expression von OPG, einem Inhibitor der Osteoklastogenese, nicht beeinflusst war. Die Expression von RANKL, einem essentieller Faktor der Osteoklastogenese und damit der Knochenresorption und des Knochenabbaus, war jedoch signifikant geringer. Die Expression des osteogenen Markers Kollagen I war ebenfalls in den mit Melatonin behandelten Tieren signifikant erniedrigt.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass die Behandlung mit Melatonin die Frakturheilung verzögert, was sich in der Frühphase der Frakturheilung in einer signifikant geringeren Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass Melatonin durch Hemmung der Expression von RANKL die Osteoklastenaktivität und damit die Knochenresorption inhibiert.

## 1.2 Summary

The secretion of melatonin, the major pineal hormone, plays a critical role in the control of the circadian rhythm, the body temperature, immunomodulation and aging. Besides, it has been indicated that melatonin also influences bone metabolism through regulation of osteoblast and osteoclast activity. The effects of melatonin on bone metabolism are presumably a result of inhibition of osteoclast activity through changing the balance between receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B ligand (RANKL), receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B (RANK) and osteoprotegerin (OPG). Although there may be substantial interest how these actions of melatonin influence bone regeneration, there is complete lack of information, whether and how it acts during the process of fracture healing. To test this hypothesis, we herein studied the effect of melatonin on callus formation, bone remodeling and RANKL and OPG expression in a stable fixed femur fracture model in mice.

For the present study a total of fifty 12 to 14 weeks old CD-1 mice were used. Twenty-five mice were treated daily with 50 mg/kg body weight (BW) melatonin i.p. Twenty-five vehicle-treated mice served as controls. Bone healing was studied in a murine closed femur fracture model using radiological, biomechanical, histomorphometric and protein biochemical analysis at two and five weeks after fracture.

Radiological analyses two and five weeks after fracture could not demonstrate significant differences between melatonin-treated animals and controls ( $p>0.05$ ). Biomechanical analysis at two weeks after fracture showed a significantly lower bending stiffness in melatonin-treated animals compared to controls. After five weeks, the melatonin-treated animals still showed a lower bending stiffness compared to controls, however, the difference did not prove statistically significant.

Histologically, all samples demonstrated a typical pattern of secondary fracture healing with callus formation, including intramembranous and endochondral ossification. At two weeks after fracture, the size of the total callus of the melatonin-treated animals was almost the same as that of controls. After five weeks, however, the callus size was significantly larger in melatonin-treated animals compared to controls. This indicates a delay in bone remodeling after melatonin treatment. Analysis of callus composition revealed that at two weeks bone formation was slightly reduced and cartilage formation was increased in melatonin-treated animals compared to controls. Analysis of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity

demonstrated a significantly reduced number of TRAP-positive cells after melatonin treatment compared to controls. TRAP activity was detected predominantly in multinuclear osteoclasts within the central region of the callus. Of interest, TRAP-positive cells could neither be found in the periosteum nor in the endosteal region of the callus. Immunostaining with a monoclonal antibody against a melatonin receptor demonstrated that osteoblasts within the callus are capable of expressing melatonin receptors. At two weeks, Western blot analysis demonstrated that expression of OPG, which is an inhibitor of osteoclastogenesis, was not affected by melatonin treatment. However, the expression of RANKL, which is an essential factor for osteoclast formation, activation and survival, promoting bone resorption and bone loss, was significantly reduced compared to controls. The expression of collagen I a marker of osteoblastogenesis, was also significantly reduced after melatonin treatment.

In conclusion, we demonstrate for the first time that melatonin induces a delay of fracture repair, as indicated by a significantly lower bending stiffness when compared to non-treated controls during the early time period of healing. The action of melatonin involves most probably an inhibition of bone resorption through down-regulation of RANKL.

# Kapitel 2

## Einleitung

### 2.1 Knochen

#### 2.1.1 Morphologie des Knochens

Man unterscheidet lange, kurze und platte Knochen. Darüber hinaus werden alle Knochen, die nicht in die drei genannten Kategorien fallen, als irreguläre Knochen bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde das Mausfemur als langer Röhrenknochen verwendet.

Man unterscheidet am Röhrenknochen folgende Bereiche:

- Epiphysen: Enden des Röhrenknochens
- Diaphyse: Mittelstück des langen Röhrenknochens
- Metaphyse: Bereich zwischen Epi- und Diaphyse

Zwischen Metaphyse und Epiphyse liegt die Epiphysenfuge, in der das Längenwachstum des Knochens stattfindet [8]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Femur im Bereich der Diaphyse frakturiert.

### 2.1.2 Histologie des Knochens

Der Knochen besteht zu ca. 20% aus Wasser. Die wasserfreie Knochenmatrix wiederum enthält zu ca. 30% organische und zu ca. 70% anorganische Substanz. Die organische Substanz besteht im Wesentlichen aus  $\alpha$ -helikalen Peptidketten, dem Kollagen. Die anorganische Substanz besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatitkristallen und enthält geringe Mengen von Kalziumcarbonat und Kalziumhydrogenphosphat [8].

Der Knochen ist umgeben von der Knochenhaut, dem Periost. Der Knochen selbst besteht aus Knochensubstanz mit der äußeren Substantia Compacta und der innen liegenden Substantia Spongiosa, einem schwammartigen Gerüstwerk feiner Knochenbälkchen. Zwischen den Bälkchen der Spongiosa liegt in der Markhöhle das Knochenmark (Abb. 2.1) [8].

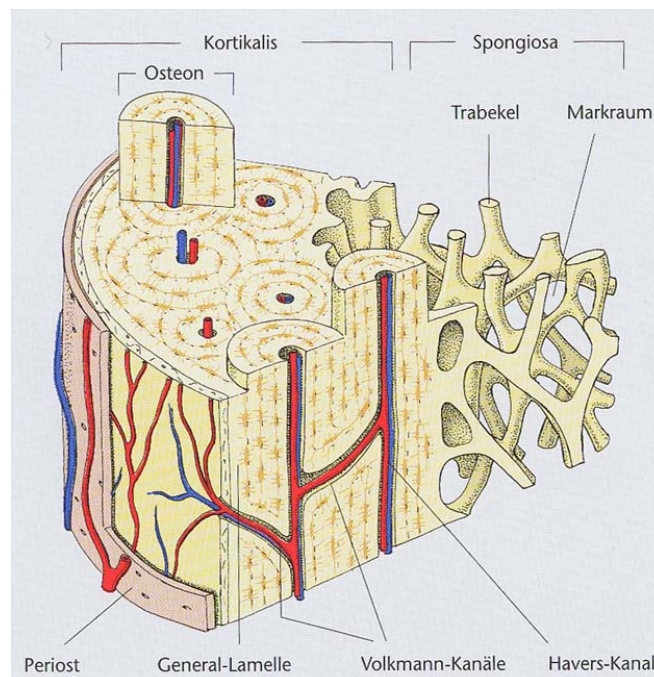


Abbildung 2.1: Knochenstruktur (Quelle: M. Trebsdorf: Biologie, Anatomie, Physiologie. Lau-Verlag, Reinbek (2000))

### **Periost**

Das Periost überzieht den Knochen mit Ausnahme der knorpeligen Gelenkflächen. Es besteht aus zwei Schichten, dem Stratum fibrosum (Faserschicht) und dem Stratum osteogenicum (knochenbildende Schicht). Das Stratum fibrosum ist für die mechanische Anbindung von Sehnen und Bändern an den Knochen zuständig. Es enthält an seiner Außenseite zugfeste Fasern und es ist über Bündel von Fasern (Sharpeysche Fasern) mit dem Knochen verbunden. Diese Fasern enden häufig in den äußeren Grenzlamellen des Knochens. Sehnen strahlen mit ihren Faserzügen meist in das Stratum fibrosum ein, fächern dort auf und werden über Fasern am Knochen befestigt. Auf diese Weise werden Zugkräfte flächig auf den Knochen verteilt [63].

Das Stratum osteogenicum ist die Knochen bildende Schicht. Sie liegt dem Knochen direkt an und enthält beim jungen Menschen reichlich Osteoblasten (Kambiumschicht) [63]. Im Stratum osteogenicum kommt es zur Zelldifferenzierung sowohl während des Knochenwachstums als auch im Rahmen der Frakturheilung. Das Stratum osteogenicum enthält kleine Gefäße und Kapillaren, die die Ernährung der Knochensubstanz gewährleisten [108]. Das Stratum osteogenicum enthält unter Anderem die Nervenfasern, die die Schmerzempfindung im Bereich des Periostes generieren.

### **Kompakta**

Die Kompakta besteht aus Knochenlamellen. Die Dicke der Kompakta beträgt bis zu 15 mm. Die Kompakta hat eine hohe Dichte und beinhaltet ca. 80% des Knochengewebes. Sie enthält Osteone bzw. das Havers-System (Abb. 2.1). Osteone sind aus konzentrischen Lamellen aufgebaut. Zwischen 5 und 20 Lamellen sind um einen zentralen Kanal (Haverskanal) herum angeordnet sind, in dem Blutgefäße und Nerven verlaufen. Ein Osteon hat einen Durchmesser von ca. 500 µm, eine Länge von ca. 0,5 bis 1 cm und einen Durchmesser des Haverschen Kanals von ca. 20 - 100 µm. Horizontal verlaufende Verbindungskanäle zwischen Zentralkanälen der Osteone werden Volkmannkanäle genannt. Aussparungen innerhalb der Osteone – Osteozytenlakunen oder Lacunae osseae genannt – beinhalten die Osteozyten (Zellen des Knochengewebes). Die Lakunen wiederum erzeugen durch kleine Kanälchen, sogenannte canaliculi ossei, Verbindungen zwischen den



Osteonen [108].

Im Vergleich zum Menschen ist der Mäuseknochen primitiver aufgebaut. Anstelle von Havers-Systemen existieren bei der Maus sogenannte Resorptionshöhlen. Im Rahmen der Frakturheilung werden diese wieder mit Osteoblasten und dadurch mit neuer Knochensubstanz aufgefüllt [78].

### **Spongiosa**

Die Spongiosa ist ein schwammartig aufgebautes Knochensystem. Sie besteht aus Knochenbälkchen (Trabekeln) und Knochenplatten (Speziallamellen), die eine Dicke zwischen 50 µm und 400 µm aufweisen. Die wabenförmige Konstruktion bewirkt eine hohe mechanische Belastbarkeit bei relativ geringem Gewicht. Im Gegensatz zu den zylindrischen Osteonen der Kortikalis sind die Osteone der Spongiosa paket- oder wandförmig aufgebaut und werden trabekuläre Osteone genannt [57]. Die Spongiosa kann belastungsabhängig umgebaut werden. Entsprechend entstehen z.B. Zugtrabekel bzw. Drucktrabekel. Innerhalb der Spongiosa verlaufen Kollagenfasern. Dies sind helixartige, zugfeste Peptidketten. Zwischen den Speziallamellen verlaufen sogenannte Schaltlamellen, die Reste von Speziallamellen darstellen. Diese verlaufen spiralförmig.

### **Knochenmark**

Während der Embryogenese wird das Knochenmark zunächst als sogenanntes rotes blutbildendes Mark angelegt, in dem sich ab dem 5.-6. Fetalmonat die Hämatopoese abspielt. Ab dem Ende des ersten Lebensjahres wird in den langen Knochen, in denen bis dahin noch Blutbildung stattfindet, das rote Mark zunehmend durch gelbes Fettmark ersetzt. Grundsätzlich findet in allen Knochen Hämatopoese statt, allerdings beschränkt sich im höheren Alter der Ort der Blutbildung auf kurze und platte Knochen. [10].

Das Knochenmark umfasst hämatopoetische Zellen, Stroma und Blutgefäße. [10].

## Knochenbildung

Der Knochen ist kein statisches Gewebe, sondern befindet sich in einem beständigen Vorgang von Auf- und Abbau. Dies geschieht durch das Zusammenwirken von knochenaufbauenden (Osteoblasten) und -abbauenden Zellen (Osteoklasten) [85].

Grundsätzlich unterscheidet man Geflechtknochen und Lamellenknochen. Geflechtknochen zeigt einen größeren Zellreichtum und weniger anorganische Bestandteile als Lamellenknochen. Die Kollagenfaserbündel im Geflechtknochen verlaufen unregelmäßig in der Grundsubstanz. Während ein Geflechtknochen entlang der Kapillaren wächst, findet das Wachstum der Lamellenknochen entlang mechanischer Kraftlinien statt [51]. Die Lamellen bestehen aus 3-7 µm dicken Knochen-schichten [108]. Diese Schichten enthalten Osteozyten und parallel verlaufende, schraubenförmig angeordnete Kollagenfasern. Dieses Bauprinzip bewirkt die Zug- und Druckbelastbarkeit des Knochen [14].

Verschiedene Zelltypen beeinflussen das Zusammenspiel von Knochenaufbau und Abbau (Abb. 2.2):

- Osteoblasten
- Knochenbelegzellen
- Osteozyten
- Osteoklasten

Osteoblasten, Knochenbelegzellen und Osteozyten stammen von lokalen Osteoprogenitorzellen mesenchymaler Herkunft ab, Abb. 2.3. Osteoblasten sind plasma-reiche, basophile Zellen, die dem Knochen an der Anbauseite anliegen. Sie bilden das Osteoid, indem sie an der Oberfläche der Knochenbälkchen neue Knochen-grundsubstanz generieren, die im weiteren Verlauf mineralisiert. Dieser Vorgang dauert beim Menschen in der Spongiosa ca. 25 Tage und in der Kortikalis ca. 35 Tage [51].

Die Knochenbelegzellen sind inaktive, flache Zellen, die die Knochenoberfläche bedecken und nicht am Knochenaufbau oder Knochenabbau teilnehmen. Möglicherweise sind sie Osteoblastenvorläufer oder ruhende Osteoblasten [5].

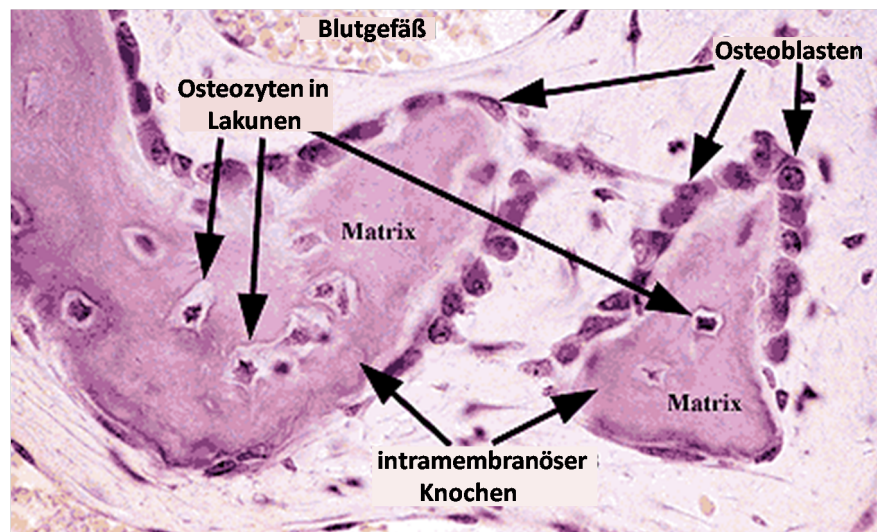


Abbildung 2.2: Knochengewebe (Quelle: [114] )

Die Osteoblasten werden nach und nach vollständig von Osteoid eingeschlossen und wandeln sich dann zu Osteozyten um [51].

Im Knochen eines adulten Menschen befinden sich ca. zehnmal mehr Osteozyten als Osteoblasten [86]. Die Osteozyten liegen jeweils zwischen den Lamellen in den Knochenhöhlen (Lacunae osseae). Die Lakunen sind mit den Osteonen über Knochenkanälchen (Canaliculi ossei) verbunden. Auf diese Weise entsteht ein Kontakt zum Havers-Kanal [51].

Mittels dendritischer Zellausläufer werden die einzelnen Osteozyten in der Knochenmatrix verknüpft und ermöglichen so einen interzellulären Austausch. Die Osteozyten sind von einem extrazellulären System aus Zellzwischenräumen und der mineralisierten Matrix umgeben.

Anders als die Knochenzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, entwickeln sich Osteoklasten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Abb. 2.3). Diese Vorläuferzellen gelangen über das vaskuläre System in den Knochen. Dort findet eine Differenzierung unter Einfluss von Osteoblasten zu Osteoklasten statt [111]. Osteoklasten enthalten Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) [72] und Kathepsine und exprimieren Calcitoninrezeptoren [74]. Sie dienen in Form von mehrkernigen Riesenzellen dem Abbau mineralisierter Knochengrundsubstanz [69]. Dabei haften die Osteoklasten mittels Zelladhäsionsmolekülen an der Knochenoberfläche an und decken so einen gewissen Raum über der Oberfläche ab, den sie mit

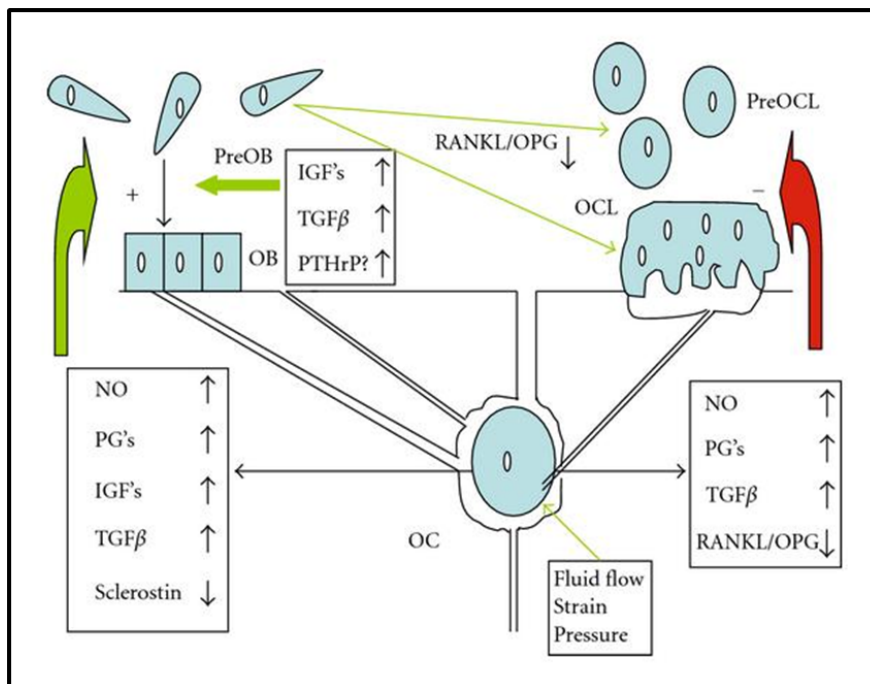


Abbildung 2.3: Schema der Zellentwicklung; OC: Osteozyt; OB: Osteoblast; OCL: Osteoklast; Pre-OB: Preosteoblast; Pre-OCL: Preosteoklast; PG's: Prostaglandin (E2 and I); RANK-L: Receptor Activator Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand; OPG: Osteoprotegerin; IGF: Insulin-like Growth Factor; TGF: Transforming Growth Factor; Scl: Sclerostin; PTHrP: Parathyroid Hormone Related Peptide; (Quelle: [9])

ihren Rändern abdichten und in dem die Knochensubstanz durch Exoenzyme abgebaut wird. Das abgebaute Material wird ins Blut abtransportiert [65].

Osteoklasten findet man in Vertiefungen an der Knochenoberfläche (Howship-Lakunen) und tiefer in der Kortikalis, in der sie Kanäle für neue Osteonen formen. So baut ein Osteoklast dieselbe Menge an Knochen ab, die 100-150 Osteoblasten zeitgleich produzieren [51].

Man unterscheidet zwei verschiedene Formen der Knochenbildung: die enchondrale und die desmale Ossifikation. In beiden Fällen entsteht als erstes Faser- oder Geflechtknochen, der in der weiteren Entwicklung zu Lamellenknochen umgewandelt wird [51].

Die enchondrale Ossifikation beinhaltet eine Knochenbildung, die über den Umweg der Ausbildung eines knorpeligen Gerüsts verläuft. Chondroblasten bilden Faserknorpel mit parallel angeordneten Kollagenfibrillen. Dabei proliferiert der ruhende

hyaline Blasenknorpel und geht in Säulenknorpel über. Eine zellulär gesteuerte Mineralisation der Kollagenfasern (Typ II) findet in der epiphysennahen Knorpelmatrix statt und führt zu sogenannten Matrixvesikeln (Zellmembranabschnürungen). Offensichtlich wird durch diese präparatorische Verkalkungszone der Abbau des Knorpelgewebes und die Neubildung von Knochen ausgelöst. Hierbei entsteht u.a. Kollagen vom Typ I. Entlang der Reste der präparatorisch verkalkten Knorpelmatrix entsteht die organische Knochenmatrix. Diese mineralisierte Matrix bildet zusammen mit den restlichen Einschlüssen der Knorpelmatrix die primäre Spongiosa. Durch Abbau der primären Spongiosa und Umordnung in lamellar geschichtete knorpelfreie Knochenbälkchen wird die sekundäre Spongiosa gebildet. Die enchondrale Knochenbildung findet hauptsächlich an den Epiphysen der langen Röhrenknochen statt und führt so zu deren Längenwachstum. Weiterhin findet man diese Form der Knochenbildung an den Rippen, den Wirbelkörpern und an Teilen der Schädelbasis [25].

Bei der desmalen Ossifikation entsteht das Knochengewebe direkt aus dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym). Es ist ein kollagenreiches Protein-Netz, das durch Einlagerung von Kalksalzen den Faser- oder Geflechtknochen bildet. Anschließend wird dieser Knochen zu lamellärem Knochen umgebaut. Die desmale Ossifikation ist im Bereich des Periost (periostale Ossifikation) und der Schädelkalotte zu finden [25].

Sowohl desmale als auch enchondrale Ossifikation spielen auch bei der Frakturheilung eine wichtige Rolle (Abschnitt 2.2.2).

### 2.1.3 Physiologie des Knochens

Die Hauptaufgaben des Knochens sind:

- Stützen
- Mechanischer Schutz der inneren Organe
- Strukturerhalt
- Mobilität
- Speicherung von Mineralien

- Blutbildung (im roten Knochenmark)

Diese Funktionen müssen langfristig aufrechterhalten werden. Deshalb sind die sich ständig wiederholenden Vorgänge von Resorption und Neubildung von wesentlicher Bedeutung. Im Ablauf folgen Wachstum, Modeling und Remodeling.

Das Wachstum der Knochen findet in den Epiphysenfugen statt. Die wesentliche Ausdehnung erfolgt in Form von Längenwachstum. Dabei nimmt der Knochen an Knochenmasse und geringfügig auch an Querschnitt zu [51]. Weiterhin ist der Knochen in der Lage, spezifische, durch mechanische Belastungen stimulierte Veränderungen der Größe und Form vorzunehmen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Modeling. Die Fähigkeit des Modeling ist in der Jugend stark ausgeprägt und nimmt mit zunehmendem Alter erheblich ab [27].

Unter Remodeling versteht man dynamische Umbauprozesse im Knochen, die von Belastungen unabhängig sind und in der Regel zu keiner Änderung des Knochenvolumens führen. Das Ziel des Remodelings ist es, die Funktionalität des Skelettsystems zu bewahren. Remodeling ist unter Anderem für die Reparatur von Mikrofrakturen verantwortlich und findet während des gesamten Lebens statt [85].

Für den miteinander gekoppelten Prozess von Knochenresorption und Knochenaufbau wird der Begriff Coupling verwendet. Osteoblasten und Osteoklasten bilden die Grundlagen dieser gekoppelten Wirkmechanismen. Die dazugehörige morphologische Struktur ist die Bone Remodeling Unit (BRU) [27], die auch als Bone Multicellular Unit (BMU) bezeichnet wird. Die BRUs bestehen aus Gruppen verschiedener Zellen, die in bestimmten Zeiträumen die Resorption und Bildung bewerkstelligen [29]. Eine komplette kortikale BRU ist ein Osteon oder Havers-System. Eine BRU schiebt sich durch den Knochen und hinterlässt neugebildete Struktur [50]. Die Knochen eines erwachsenen Menschen enthalten insgesamt ca.  $2 \times 10^7$  BRUs [84].

Durch das Remodeling werden pro Jahr 3% des kortikalen und 25% des trabekulären Knochens umgebaut. Die Regulation dieses Umbauprozesses wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst (Abschnitt 2.2.3).

Das Ausmaß der Knochenneubildung hängt sowohl von der Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität pro BRU als auch von der Anzahl der BRUs ab [88]. Typischerweise wird jede Stelle an der Oberfläche eines Knochens innerhalb von ca. zwei bis vier Jahren ausgetauscht [88].

## 2.2 Frakturheilung

Man unterscheidet zwischen der primären und der sekundären Frakturheilung. Der Ablauf ist abhängig von Art und Ausmaß der Fraktur sowie von der Stabilisierung der Frakturenden.

### 2.2.1 Primäre Frakturheilung

Die primäre Frakturheilung findet bei kleinen Knochendefekten bzw. schmalen Frakturspalten statt und läuft, anders als die sekundäre, ohne Ausbildung einer Kallusmanschette ab [26]. In Abhängigkeit von der Frakturspaltbreite unterscheidet man bei der primären Heilung zwischen Kontaktheilung und Spaltheilung. Bei den meisten Knochenbrüchen unter primärer Heilung treten beide Heilungsformen parallel auf, da die Spaltbreite an verschiedenen Stellen des Bruchs unterschiedlich groß sein kann.

Bei einer Breite des Frakturspaltes von weniger als ca. 0,2 mm findet die Kontaktheilung statt [103]. Durch die Aktivierung der Osteoklasten wird ein sogenannter Resorptionskanal gebildet, der anschließend vaskularisiert und mit neuem Knochen aufgefüllt wird [90].

Bei einer Breite des Frakturspaltes größer als ca. 0,2 mm bis zu einigen Millimetern findet die Spaltheilung statt. In einem Zwischenschritt wird zuerst ein fibroblasten- und kapillarreiches Granulationsgewebe im Frakturspalt gebildet, das innerhalb von drei bis vier Wochen durch Geflechtknochen ersetzt wird. In der nachfolgenden Phase wird das neu gebildete Knochengeflecht zu Lamellenknochen umgewandelt [103].

Vorraussetzungen für eine primäre Knochenheilung sind eine stabile osteosynthetische Versorgung sowie eine ausreichende Vaskularisierung der Frakturzone [71].

Es ist bis dato nicht bekannt, ob in der Maus eine primäre Frakturheilung existiert. Die bisher verwendeten Frakturmodelle verlaufen über eine sekundäre Frakturheilung [40], [68].

### 2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Besteht zwischen den Fraktarenden keine ausreichende Stabilität oder ist der Frakturspalt zu groß, so läuft der Heilungsprozess als sekundäre Frakturheilung ab. Der überwiegende Teil der Knochenbrüche heilt sekundär. Ein Beispiel ist die Heilung unter konservativer Gipsbehandlung, die eine gewisse interfragmentäre Beweglichkeit zulässt [71].

Bei der sekundären Frakturheilung handelt es sich um Regenerationsprozesse, die intramembranöse und enchondrale Knochenbildung beinhalten. [26]. Ein wichtiges Merkmal ist die Bildung von Kallusgewebe im Bereich des Frakturspalt (Abb. 2.4). Das gebildete Kallusgewebe besteht während der verschiedenen Heilungsphasen aus unterschiedlichen Anteilen von Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe und hat dementsprechend eine unterschiedliche mechanische Stabilität [70].



*Abbildung 2.4: Kallusbildung: Humanes Präparat eines Femurschaftes mit Ausbildung eines Frakturkallus (Bild: Prof. Uehlinger, Universitätsklinik des Saarlandes, [25])*

Die sekundäre Frakturheilung beinhaltet die folgenden fünf Phasen:



- Frakturphase mit Hämatombildung
- Entzündungsphase
- Granulationsphase
- Phase der Kallushärtung
- Phase des Umbaus (Remodeling)

Diese Phasen der sekundären Frakturheilung sind im Folgenden kurz dargestellt.

### **Frakturphase und Hämatombildung**

In der Frakturphase werden Kortikalis, Spongiosa, Knochenmark, Periost und in der Regel auch das umliegende Weichteilgewebe verletzt. Unmittelbar folgend auf das Trauma entsteht zunächst ein Hämatom, das sowohl aus Zellen des peripheren und intramedullären Blutes sowie auch des Knochenmarks besteht [70].

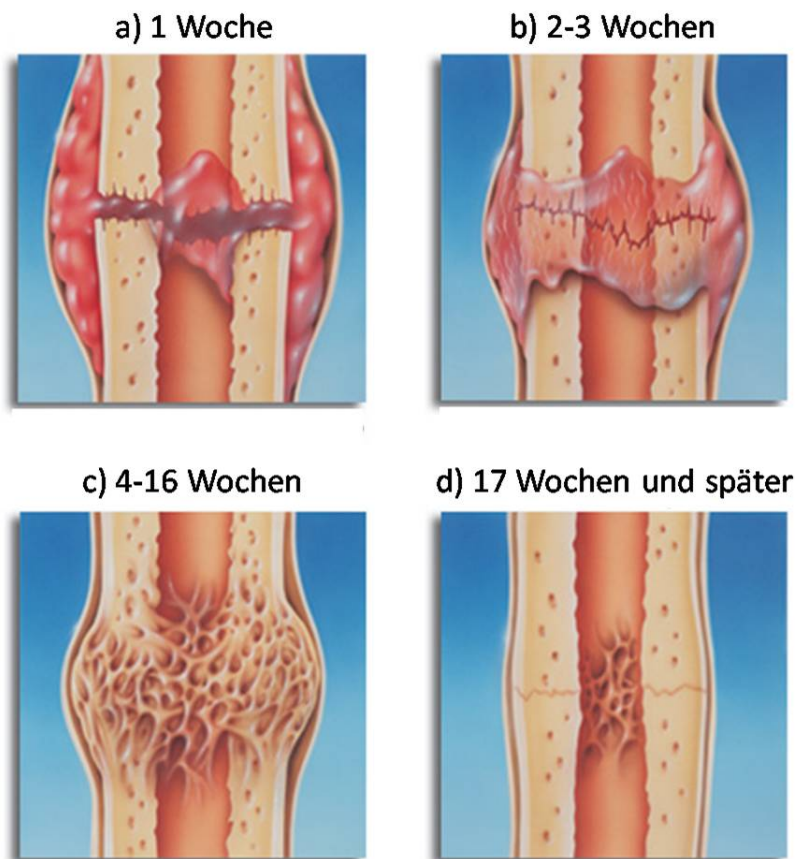
### **Entzündungsphase**

Die Verletzung induziert eine Entzündungsreaktion, die für den Heilungsprozess Voraussetzung ist [32]. Die Phase der Entzündung hat ein Maximum innerhalb der ersten 24 Stunden und ist nach ca. 7 Tagen abgeschlossen. Diese Reaktion beinhaltet die Bildung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-11 und IL-18). Diese Faktoren aktivieren inflammatorische Zellen und fördern die Angiogenese. IL-1 und IL-6 sind hierbei die wohl wichtigsten Faktoren [70]. IL-6 wird zum Beispiel in der akuten Phase produziert und stimuliert die Angiogenese durch Bildung des Wachstumsfaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [21] sowie die Zelldifferenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten [123].

### **Granulationsphase**

Dem primären Hämatom folgend wird ein fibrinreiches Granulationsgewebe gebildet. Dieser weiche Kallus verbindet die Frakturrenden in Form einer Manschette (Abb. 2.5), die eine semistabile Struktur mit mäßiger Biegesteifigkeit darstellt [70].

Das Granulationsgewebe hat eine hohe Elastizität, die eine Längenänderung um bis zu 100% ermöglicht [122]. Im Vergleich dazu beträgt die Dehnbarkeit von ausdifferenziertem Bindegewebe ca. 15% und von lamellärem Knochen ca. 2%. Entscheidend für die mechanische Stabilität ist die Steifigkeit der Struktur. Dabei ist die Dicke der Kallusmanschette von wesentlicher Bedeutung, da die Steifigkeit proportional zur vierten Potenz des Durchmessers steigt [90]. Bei der Maus erreicht die Kallusmanschette ca. 10 bis 14 Tage nach der Fraktur ihr Maximum [68].



*Abbildung 2.5: Frakturheilungsphasen beim Menschen: a) Hämatom und Entzündungsphase, b) Granulationsphase (weicher Kallus), c) Phase der Kallushärtung, d) Phase des Umbaus (Modeling und Remodeling); (Quelle: [114])*

### **Phase der Kallushärtung**

In dieser Phase erfolgt die Umsetzung des primär knorpeligen weichen Kallus in den harten Kallus. Dieser Vorgang geht mit einer zellulären Proliferation und Differenzierung einher, die zu einem erhöhten zellulären Volumen und einer Kalzifizierung der extrazellulären Matrix führt. Dabei wird Kalzium aus Mitochondrien von Chondrozyten bezogen, welche Kalzium enthalten, das in hypoxischem Gewebe gebildet worden ist. Eine Abfolge von Prozessen führt zur Resorption des mineralisierten Gewebes. [70].

### **Phase des Umbaus (Remodeling)**

In dieser Phase des "Bone Remodelings", wird der zuvor gebildete harte Kallus durch Osteoklasten resorbiert und durch Osteoblasten wird neuer, lamellärer Knochen gebildet. Dieser Vorgang beginnt drei bis vier Wochen nach Frakturierung und dauert oft Jahre [36], [70].

### **2.2.3 Wachstumsfaktoren**

Die Knochenregeneration wird durch Wachstumsfaktoren beeinflusst. In der hier vorliegenden Arbeit wurden folgende Faktoren analysiert:

- Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$  B Ligand (RANKL) gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF). RANKL stimuliert die Differenzierung von Osteoklasten-Progenitorzellen bzw. die Aktivität von Osteoklasten, indem es an RANK in der Zellmembran dieser Zellen bindet. RANKL wird von Osteoblasten exprimiert. RANKL wird somit als Marker der Osteoklastenaktivität verwendet [118].
- Osteoprotegerin (OPG) gehört ebenfalls zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF). Es inhibiert die Aktivität von Osteoklasten, indem es als löslicher Rezeptor RANKL bindet. OPG wird in Osteoblasten exprimiert und wird als Marker der Osteoblastenaktivität verwendet [59].
- Kollagen I gehört zur Proteinfamilie der Kollagene und wird von Osteoblasten exprimiert. Kollagenmoleküle formen Fibrillen und bilden mehr als 90% der

organischen Knochenmatrix. Kollagen I wird als Indikator der Osteogenese herangezogen [8].

- Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und Reparatur und dient als Marker der Zellproliferation [120].

## 2.2.4 Frakturmodelle

Zwar können durch humane klinische Studien und in-vitro-Studien viele Erkenntnisse über den Ablauf der Knochenbruchheilung gewonnen werden, dennoch sind Tiermodelle aufgrund der zahlreichen Interaktionen der verschiedenen Zellen und Gewebearten für die Frakturheilungsforschung unabdingbar. Bis heute wurden zahlreiche Frakturmodelle verschiedener Tierarten entwickelt [78]. Die Häufigkeit des Einsatzes der verschiedenen Tiermodelle ist von O Loughlin et al. [81] untersucht worden (Abb. 2.6). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Frakturmodell der Maus verwendet. Grundsätzlich müssen jedoch Studien am Tiermodell hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen immer kritisch geprüft werden.

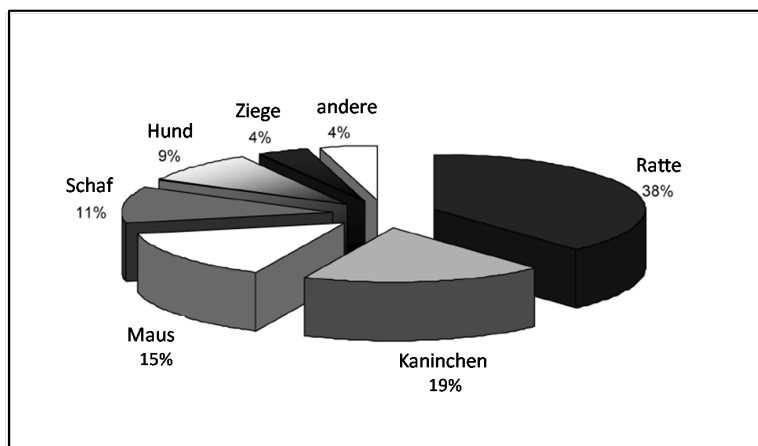


Abbildung 2.6: Häufigkeit des Einsatzes verschiedener Tiermodelle zur Untersuchung der Frakturheilung (Quelle: [81])

Lange Zeit hat man Tiere wie Hunde [80], Kaninchen [60] oder Schafe [79, 91] für die Untersuchung von Frakturheilungsprozessen bevorzugt, weil bei diesen Tieren der Heilungsprozess genau wie beim Menschen über die Havers-Systeme erfolgt.

Zudem können die Implantate für die Stabilisierung der Fraktur und die chirurgischen Prozeduren für diese Tiere von der Klinik ins Labor übertragen werden [78]. Zusätzlich sind biomechanische Testungen an Großtieren einfacher durchführbar [81]. Bei Großtieren kann aus Kostengründen nur eine geringe Anzahl an Versuchstieren eingesetzt werden. Demgegenüber bieten Kleintiere wie Ratten und Mäuse Vorteile bezüglich der Zuchtbedingungen und der Handhabung, so dass kostengünstig große Gruppengrößen untersucht werden können. Die Anatomie der Knochen stellt jedoch eine große Herausforderung an die operativen Techniken dar. Deshalb wurde in früheren Studien oft auf eine Stabilisierung der Fraktur verzichtet [43]. Eine reproduzierbare Frakturierung und osteosynthetische Stabilisierung des Mäusefemur verlangt dementsprechend ein ausgeprägtes operatives und technisches Geschick [49].

Entscheidend ist, dass das Genom der Maus vollständig entschlüsselt ist und somit ein großes Spektrum transgener Stämme sowie spezifischer Antikörper zur Untersuchung der molekularbiologischen Zusammenhänge zur Verfügung stehen [101].

Ein Nachteil von Ratten und Mäusen für das Studium der Frakturheilung ist dadurch gegeben, dass sie eine sehr einfache Knochenstruktur ohne Haversssysteme besitzen [78]. Im Gegensatz zu größeren Tieren besitzen Ratten und Mäuse Resorptionshöhlen für das Remodeling von Knochen [41]. Diese Resorptionshöhlen werden im Frakturbereich gebildet und werden im weiteren Heilungsverlauf mit Osteoblasten ausgefüllt. Dieses System des Remodelings ist dem des Menschen zwar sehr ähnlich, dennoch ist zum Teil unklar, welche Bedeutung diese Unterschiede für den Ablauf des Frakturheilungsprozesses haben.

Tatsache ist jedoch, dass in den vergangenen Jahren die Anzahl von Studien an Kleintieren stark zugenommen hat (Abb. 2.7).

In bisher erschienenen Publikationen wurden Frakturmodelle der Maus zur Untersuchung der Frakturheilung an der Rippe, der Tibia und dem Femur beschrieben [12], [40], [49], [76], [48], [68].

Während die Rippe wegen ihrer anatomischen Form und Größe für biomechanische Testungen ungeeignet ist, eignen sich Tibia und Femur für derartige Untersuchungen besser. Das Mäusefemur hat gegenüber der Tibia den Vorteil, dass es einen einheitlichen runden Querschnitt bei guter Weichteildeckung besitzt [18].

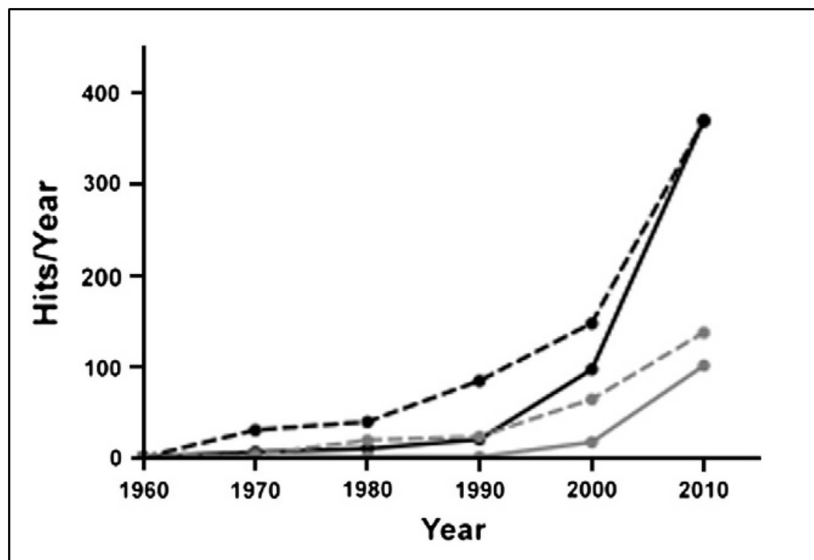


Abbildung 2.7: Zahl der Publikationen pro Jahr im Zeitraum 1960 bis 2010 mit folgenden Suchbegriffen: *bone repair and rats* (gestrichelte schwarze Kurve), *bone repair and mice* (schwarze Kurve), *fracture healing and rats* (gestrichelte graue Kurve), *fracture healing and mice* (graue Kurve). (Quelle: [41])

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen offenen und geschlossenen Frakturmodellen der Maus. Bei den offenen Frakturmodellen wird der Knochen unter Sicht osteotomiert. Dazu wird der Knochen über einen lateralen Zugang freipräpariert und mittels Gigly-Säge osteotomiert [18], [42].

Die geschlossenen Frakturmodelle beziehen sich auf das von Bonnarens und Einhorn beschriebene Modell an der Ratte [11]. Mit Hilfe einer stumpfen Guillotine wurde ein standardisierter transverser Frakturverlauf unter geringem Weichteilschaden erzeugt. Vergleichbare Modelle wurden anschließend für die Tibia [39] und das Femur der Maus [68] publiziert. Bei diesen Modellen erfolgte die Stabilisierung der Fraktur mittels eines intramedullären Pins [11]. Nachteil dieser Stabilisierungstechnik ist jedoch, dass keine ausreichend stabile Versorgung erzielt werden kann [43].

Mittlerweile wurden in unserer Arbeitsgruppe verschiedene Implantate für das Mäusefemur entwickelt. Dazu gehört ein Verriegelungsmarknagel [48], der durch eine beidseitige Abflachung einer herkömmlichen Spritzkanüle eine höhere Rotationsstabilität als beim herkömmlichen Pin gewährleistet. Mit der sogenannten intramedullären Zugschraube (MouseScrew) konnte zudem ein Implantat entwickelt

werden, mit dem zusätzlich eine axiale Stabilität erreicht werden kann [47]. Diese Schraube wurde in der hier vorliegenden Arbeit verwendet.

## 2.3 Melatonin

### 2.3.1 Historie

Das Hormon Melatonin wird in der Glandula Pinealis - auch Epiphyse oder Zirbeldrüse genannt - freigesetzt. Die Epiphyse wurde erstmals von Galen (130 -200 n. Chr.) beschrieben, der sich wiederum auf den griechischen Anatom Herophylos (325 - 380 v. Chr.) berief. Bei den griechischen Philosophen galt die Zirbeldrüse als der Sitz der Seele. Im siebzehnten Jahrhundert identifizierte der französische Wissenschaftler Descartes zutreffenderweise die Glandula Pinealis als einen Ort, von dem die Kontrolle der Körperbewegungen ausgeht [58]. Descartes ging allerdings von einem mechanistischen Bild des Menschen aus und sah die Glandula Pinealis als den wesentlichen Ort, der z.B. stimuliert durch die Retina mechanische Bewegungen auslöst [22].

Im Jahre 1958 gelang es dem Dermatologen Aaron B. Lerner die Struktur von Melatonin zu beschreiben. Dies war der Beginn einer intensiven Melatoninforschung. Mittlerweile gibt es ein eigenes Journal für diesen Forschungsschwerpunkt, das Journal of Pineal Research. Anfangs fokussierte sich die Forschung auf die Beeinflussung der Fertilität beim Menschen [52]. Es war der Entdecker Lerner, der als Erster den Einfluss von Melatonin auf den Schlaf untersuchte. Die Erkenntnisse von Richard Wurtmann, dass Melatonin nur während der Dunkelheit in den Kreislauf sezerniert wird, und von Alfred Levy, dass helles Licht während der Nacht auch beim Menschen mit einer Unterdrückung endogenen Melatonins einhergeht, führten zu einer engen Verknüpfung von Chronobiologie und Melatoninforschung [58].

In den 1990er Jahren wurden weitere Wirkungen von Melatonin berichtet, wie z.B. die Immunmodulation, Hemmung von Tumorwachstum oder den Einfluss auf Sauerstoffradikale [94]. 1995 löste das Buch *The Melatonin Miracle* von Pierpaolini et al. eine weit verbreitete Einnahme von Melatonin in der US-Bevölkerung aus, weil man Melatonin eine Verjüngungswirkung zuschrieb. Später entwickelte sich eine

eher skeptische Betrachtung der Wirkweise [58].

### 2.3.2 Struktur und Synthese

Abbildung 2.8 zeigt die Strukturformel von N-Acetyl-5-methoxytryptamin, das unter der Bezeichnung Melatonin bekannt ist und als Summenformel durch  $C_{13}H_{16}N_2O_2$  beschrieben wird. Melatonin ist ein Metabolit des Tryptophanstoffwechsels und wird aus Serotonin gebildet (Abb.2.9). Die Biosynthese erfolgt in zwei Schritten: zunächst wird Serotonin mit Acetyl-Coenzym-A N-acetyliert, als Katalysator wirkt das Enzym Serotonin-N-Acetyltransferase (AANAT). Anschließend wird das Produkt N-Acetylserotonin mit S-Adenosylmethionin mittels der Acetylserotonin-O-Methyltransferase methyliert.

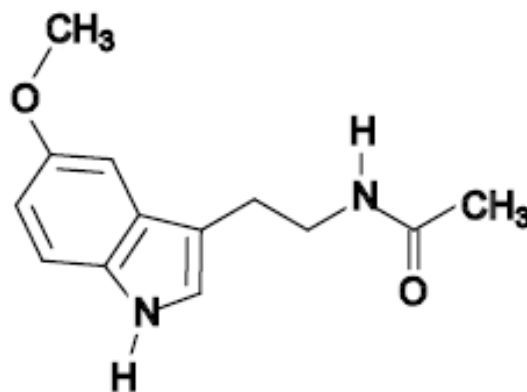


Abbildung 2.8: Strukturformel des Melatonins ( $C_{13}H_{16}N_2O_2$ )

Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Syntheseweges ist die Serotonin-N-Acetyltransferase (AANAT). Deshalb greifen hier sämtliche regulatorische Mechanismen in den Syntheseweg ein, welche die Aktivität und Proteinmenge der AANAT und somit auch die gesamte Melatoninbiosynthese kontrollieren. AANAT ist daher das Schlüsselenzym für die Synthese von Melatonin (Abb. 2.9).

Beim Menschen ist die Zirbeldrüse der wesentliche Sekretionsort für Melatonin. Eine geringe extrapineale Melatoninproduktion findet auch in der Retina und im menschlichen Ziliarkörper statt. Typische Melatoninkonzentrationen beim Menschen sind 10 - 40 pg/ml (Pikogramm pro Milliliter) am Tag und etwa 60 - 120 pg/ml nachts, bei Kindern wurden Werte bis 300 pg/ml nachts gemessen, bei älteren Menschen ist die Konzentration geringer (20 - 50 pg/ml nachts). Melatonin wird in



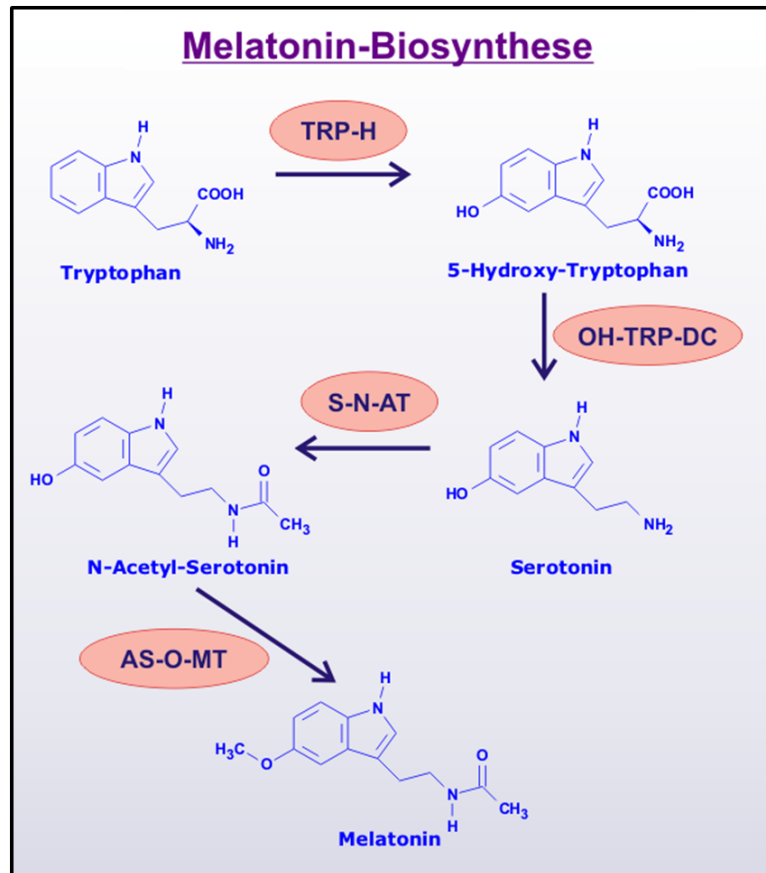


Abbildung 2.9: Biosynthese des Melatonins; TRP-H: Tryptophan-Hydroxylase, OH-TRP-DC: 5-Hydroxy-Tryptophan-Decarboxylase, S-N-AT: Serotonin-N-Acetyl-Transferase (AANAT), AS-O-MT: Acetyl-Serotonin-O-Methyl-Transferase (Quelle: pharmexplorer.at)

der Leber zu 6-Sulphatoxy-Melatonin abgebaut und über die Nieren ausgeschieden. Die Abbaupzeit (Halbwertszeit) beträgt ca. 20 bis 50 Minuten [117].

### 2.3.3 Wirkmechanismus

Melatonin beeinflusst vielfältige physiologische Prozesse [54] wie den Biorhythmus [96], reproduktive Funktionen [98], die Körpertemperatur [16], die sexuelle Aktivität [24], die Immunmodulation [62] und die Alterung [106]. Einige seiner Wirkungen sind mit der Einleitung und der Aufrechterhaltung des Schlafes gekoppelt [23].

Die zirkadiane Rhythmik erfolgt im Wesentlichen durch die lichtabhängige Sekretion von Melatonin. Bei beginnender Dunkelheit setzen die sympathischen Nerven-

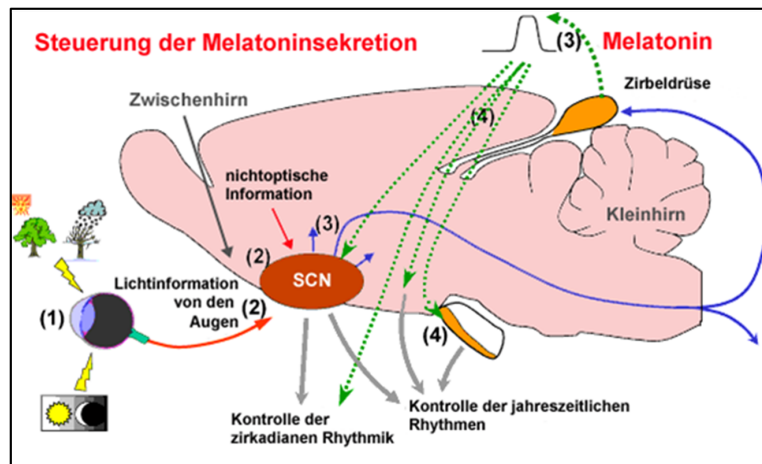


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Insekretion von Melatonin; SCN= suprachiasmatischer Nucleus (Quelle: A.Zverev, EGBs e-Learning, Denver, USA )

endigungen an der Glandula Pinealis Norepinephrin frei, wodurch eine Kaskade ausgelöst wird. Die Freisetzung des zellinternen Botenstoffes cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) stimuliert die Aktivität von N-Acetyltransferase, welches das limitierende Enzym der Synthese von Tryptophan über Serotonin zu Melatonin darstellt. Melatonin gelangt schließlich durch passive Diffusion ins Gefäßsystem. Das Maximum der Sekretion, das ungefähr das 10-fache der Tagessekretion beträgt, wird etwa in der Mitte der Nacht erreicht und nimmt in der zweiten Nachthälfte wieder ab. Melatonin wirkt schlaffördernd und vermindert die Körpertemperatur [58].

Melatonin vermittelt seine schlafregulierenden Effekte vermutlich über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (MT1 und MT2) im suprachiasmatischen Nucleus des Hypothalamus (Abb. 2.11) [121]. Ein weiterer Rezeptor für Melatonin (MT3) wurde als Chinon-Reduktase-2 identifiziert, allerdings ist über die physiologische Funktion dieses Rezeptors bisher wenig bekannt [121],[77]. Anders als die bisher verfügbaren Hypnotika wirkt Melatonin nicht direkt auf GABA-Rezeptoren ( $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptoren). Allerdings konnte eine indirekte Beeinflussung des GABAergen Systems nachgewiesen werden [110]. Die Expression von MT1- und MT2-Rezeptoren findet auch in den Herzgefäßen statt und führt zu einer Verengung der Herzgefäße.

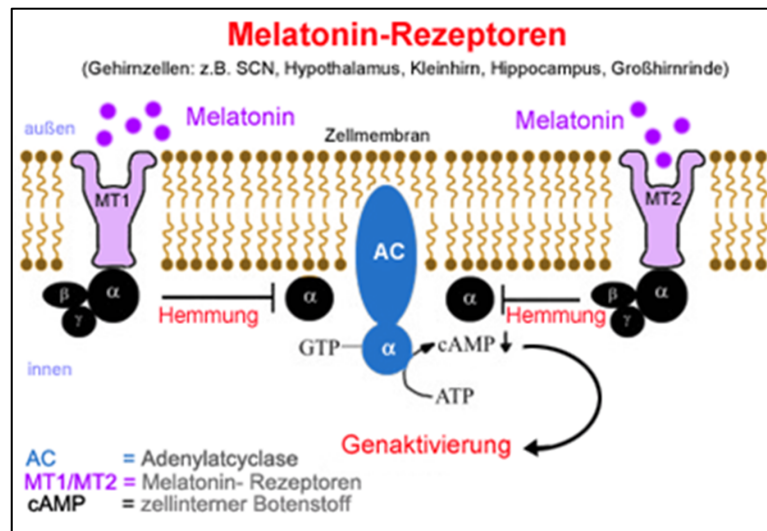


Abbildung 2.11: Melatoninrezeptoren im Gehirn; (Quelle: A.Zverev, EGBs e-Learning, Denver, USA )

### 2.3.4 Indikationen und Anwendungen von Melatonin

Die wichtigste Wirkung von Melatonin liegt in seinen hypnotischen, also schlaffördernden Eigenschaften. So erhöht Melatonin die Schlaffeffizienz und verkürzt die Zeit bis zum Einschlafen (Sleep Latency). Der nächtliche Melatoninpeak scheint eine Art Triggerwirkung zu haben, die den Schlaf einleiten könnte [3]. Waldhauser entdeckte 1990, dass Melatonin die frühen Schlafphasen verkürzt und den REM-Schlaf verlängert [116]. Diese Wirkungen werden durch Melatonin oder Melatoninanaloga therapeutisch genutzt. Es gibt auch die Hypothese, dass der durch den nächtlichen Anstieg des Melatoninspiegels ausgelöste Temperaturabfall einer der Trigger für das Einschlafen sein könnte [13].

Melatonin hat auch Einfluss auf den Schlafrhythmus und wird deshalb zur Behandlung des Jet Lag eingesetzt [38].

Melatonin hat eine stimulierende Wirkung auf das Immunsystem. Die Wirkung geht auf die T-Helfer-Lymphozyten zurück, die unter Melatonineinfluss mehr Interleukin-2 und Interleukin-4 produzieren [66]. Melatonin könnte so einen Teil der das Immunsystem hemmenden Effekte des Stresses kompensieren, da Melatonin unter Stress vermehrt ausgeschüttet wird [66].

Melatonin wird auch eine krebshemmende Wirkung zugesagt. Diese wird mit der

Eigenschaft als Radikalfänger und der immunstimulierenden Wirkung begründet [113]. Die krebshemmende Wirkung des Melatonins wird auch mit einem antiproliferativen, antimitotischen Effekt erklärt [4]. Der damit verbundene hemmende Effekt auf die Entstehung von Tumoren wird von Christian Bartsch mit der Wirkung des Melatonin auf die Gonaden und ihre Hormonproduktion in Zusammenhang gebracht [7]. Demnach könnte ein niedriger Melatoninspiegel zu desynchronisierten endokrinen Rhythmen und zu einer Entwicklung ultradianer Sekretionsrhythmen führen [7], also von Rhythmen, die mit einer Periodenzeit von mehr als 24 Stunden auftreten. Bisher ist allerdings nicht nachgewiesen worden, dass medikamentös verabreichtes Melatonin die Überlebenswahrscheinlichkeit von Krebspatienten erhöht [7].

In manchen Zusammenhängen werden Melatonin geradezu Wundereigenschaften zugesprochen, wie z.B. eine lebensverlängernde Wirkung [97]. Diese Spekulationen stützen sich auf Veröffentlichungen von G.Maestroni und W. Pierpaoli [93] in der Schweiz und R. J. Reiter und J. Robinson [97] in den USA. Sie erscheinen aber als unzulässige Extrapolationen, die sich bis jetzt nicht beweisen ließen.

Als Nebenwirkungen von Melatoninpräparaten wurden z.B. Müdigkeit oder Schläfrigkeit, Reizbarkeit, Schlaflosigkeit, Migräne, Schwindel, Bauchschmerzen, Verstopfung, Mundtrockenheit, vermehrtes Schwitzen, Schwäche und Gewichtszunahme genannt [92].

### **2.3.5 Einfluss von Melatonin auf den Knochenmetabolismus**

Verschiedene Studien konnten bisher zeigen, dass Melatonin durch Regulation der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität den Knochenmetabolismus beeinflusst [119, 56, 2, 64]. In Untersuchungen an Prä-Osteoblasten bei Mäusen und an Osteosarkomzellen bei Ratten wurde nachgewiesen, dass Melatonin die Osteoblasten-Reifung fördert. Bei diesen Versuchen führte die Gabe niedriger Melatonin-Konzentrationen zu einer erhöhten Expressierung osteogener Faktoren wie z.B. alkalische Phosphatase, Osteopontin und Osteokalzin [102]. Eine aktuelle Studie konnte zudem zeigen, dass Melatonin auch chondrogene Faktoren beeinflusst. Es konnte nachgewiesen werden, dass Melatonin die chondrogene Differenzierung von Stammzellen fördert [30]. Sowohl die osteogene als auch die chondrogene Differenzierung sind entscheidend für die Frakturheilung im Rahmen der enchon-

dralen und intramembranösen Ossifikation.

Die anabole Wirkung von Melatonin auf den Knochen wird aber vor allem durch Hemmung der Knochenresorption erklärt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Melatonin die RANKL-Expression vermindert und damit die Osteoklastenaktivität hemmt [56, 59, 115]. So konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Melatonin bei ovariectomierten Ratten zu einer Zunahme der Knochendichte führt [115]. So wird zum Beispiel eine deutliche Abnahme der Melatonin- Sekretion während der Menopause [104] als wichtiger Faktor in der Entstehung der Osteoporose angesehen.

# Kapitel 3

## Zielsetzung und Fragestellung

### 3.1 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, zu untersuchen, ob Melatonin die Frakturheilung im Mausmodell beeinflusst.

### 3.2 Fragestellung

Die Untersuchungen sollen klären, ob ein Unterschied zwischen der Frakturheilung unter Behandlung mit Melatonin gegenüber der Frakturheilung ohne entsprechende Behandlung besteht. Dabei war bisher nicht bekannt, ob Melatonin den Ablauf der Frakturheilung hemmt, unbeeinflusst lässt oder gar fördert. Die Frage soll in einer tierexperimentellen Studie beantwortet werden.

Die Nullhypothese lautet:

**„Die Frakturheilung Melatonin-behandelter Mäuse (Verum) weist keinerlei Unterschiede verglichen mit der Frakturheilung unbehandelter Mäuse (Kontrollen) auf.“**

Zur Überprüfung der Hypothese wurde die Knochenbruchheilung zwei und fünf

### 3 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

---

Wochen nach Frakturierung mit Hilfe radiologischer, biomechanischer, histomorphometrischer sowie proteinbiochemischer Methoden am postmortalen Knochen-Präparat untersucht.

# Kapitel 4

## Material und Methoden

### 4.1 Versuche

#### 4.1.1 Studienprotokoll

Die Tierversuche mit der Versuchsnummer 26/07 wurden von der zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen - Zentralstelle, Konrad-Zuse-Straße 11, 66115 Saarbrücken) genehmigt und am Institut für Klinisch- Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden CD-1 Mäuse (ICR/CD-1 outbred mice; Harlan Laboratories, Wilmington, USA) verwendet. Diese Mäuse waren zum OP-Zeitpunkt zwischen 12 und 14 Wochen alt. Das Gewicht betrug  $27 \pm 1$  g.

Die Tierhaltung der Mäuse erfolgte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in einem klimatisierten Raum bei einer Temperatur von 22 - 24 Grad Celsius und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Die Mäuse wurden bei 12-stündigem Tag - Nachtrhythmus in Kleintierkäfigen gehalten. Den Tieren stand Wasser und Standarddiätfutter der Firma Altromin (Altromin 1320, Altromin, Lage, Deutschland) in Pelletform ad libidum zur Verfügung.

Insgesamt wurden 50 Tiere untersucht. Die Mäuse wurden vor Versuchsbeginn in



#### 4 MATERIAL UND METHODEN

---

	Melatonin		Kontrollen	
Standzeit	2 Wochen	5 Wochen	2 Wochen	5 Wochen
Radiologie	n=10	n=10	n=10	n=10
Biomechanik	n=10	n=10	n=10	n=10
Histomorphometrie	n=10	n=10	n=10	n=10
Western Blot	n=5	-	n=5	-

*Tabelle 4.1: Anzahl der Versuchstiere für die verschiedenen Untersuchungen. Die radiologischen, biomechanischen und histomorphometrischen Untersuchungen wurden jeweils am selben Tier durchgeführt.*

zwei Gruppen von je 25 Tieren eingeteilt. Den Tieren der Melatonin-Gruppe (Anzahl n=25) wurde täglich 50 mg/kg Körpergewicht Melatonin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) i.p. während der gesamten 2-wöchigen bzw. 5-wöchigen Beobachtungszeit verabreicht. Den Tieren der Kontrollgruppe (n=25) wurde eine entsprechende Menge Ethanolösung verabreicht. Die radiologischen, biomechanischen und histomorphometrischen Untersuchungen wurden jeweils am gleichen Tier durchgeführt.

Der Heilungszustand sollte in einer frühen und einer späten Phase der Frakturheilung untersucht werden. Deshalb wurde jede Tiergruppe nochmals unterteilt in eine 2-Wochen-Gruppe und eine 5-Wochen-Gruppe. Diese Beobachtungszeiten wurden gewählt, weil bei der Maus das Maximum der Kallusbildung nach ca. zwei Wochen (frühe Frakturheilungsphase) erreicht ist [68]. Nach fünf Wochen (späte Frakturheilungsphase) ist die Fraktur knöchern konsolidiert [68].

Zehn Tiere der 2-Wochen Gruppe wurden 14 Tage nach der OP euthanisiert und deren Femora biomechanisch, röntgenologisch und histomorphometrisch untersucht. Fünf weitere Tiere der 2-Wochen-Gruppe wurden ebenfalls getötet und der gewonnene Kallus wurde einer Protein-biochemischen Analyse unterzogen.

Die zehn Tiere der 5-Wochen-Gruppe wurden 35 Tage nach der OP getötet und deren Femora ebenfalls biomechanisch, röntgenologisch und histologisch untersucht. Nach fünf Wochen Frakturheilung wurde auf eine Protein-biochemische Analyse des Kallusgewebes verzichtet, da keine ausreichende Menge Kallusgewebe bei bereits begonnenem Remodelingprozess gewonnen werden konnte.

### 4.1.2 Tiermodell

Für diese Arbeit wurde die sogenannte Mouse Screw als geschlossenes Frakturmodell verwendet [47]. Das Implantat ermöglicht durch ein proximales Gewinde und einen distalen Konus im Sinne einer Zugschraube eine Frakturspaltkompression und besitzt somit eine hohe Rotationsstabilität als auch axiale Stabilität. Dieses Modell wurde bereits in anderen Arbeiten verwendet [46], [45], [44].

### 4.1.3 Implantate

Die Schraube ist aus medizinischem Stahl gefertigt. Sie ist 18 mm lang und hat einen Durchmesser von 0,5 mm. Das Gewinde (M 0,5 mm) am proximalen Ende hat eine Länge von 4 mm und der konische Kopf am distalen Ende hat einen maximalen Durchmesser von 0,8 mm (Abb. 4.1). Die Schraube wurde in Zusammenarbeit mit der AO Foundation, Research Implant System (RIS), Davos (Schweiz) entwickelt.

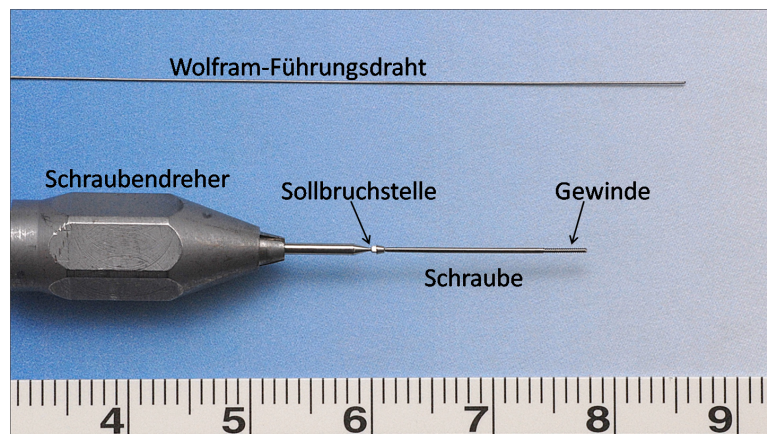


Abbildung 4.1: oben: Führungsdraht aus Wolfram; unten: Schraubendreher mit eingespannter Schraube

### 4.1.4 Operation

Zu Beginn der Operation wurde das Tier mit einer Dosis von 25 mg/kg KG Xylazin und 75 mg/kg KG Ketamin narkotisiert. Anschließend wurde die Rasur der rechten unteren Extremität vorgenommen.

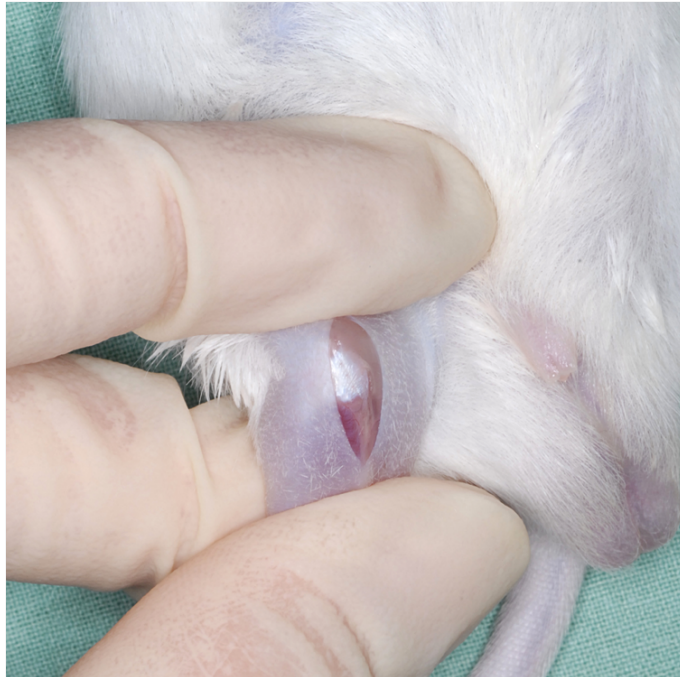
Nach der Hautdesinfektion wurde medial der Patella eine 4 mm lange Hautinzision durchgeführt, die Kapsel eröffnet und die Patella nach lateral luxiert (Abb. 4.2).

Anschließend wurde der Markraum des Femur mittels einer Kanüle (BD Micro-lance 3™ - 24 G 1" - Nr.17, Ø 0,55 x 25 mm - BD Drogheda, Irland) über die Fossa intercondylaris eröffnet (Abb. 4.3). Danach wurde eine 27-Gauge-Dental-Anästhesiekanüle (Sterican® Einmalkanüle für die Dental-Anästhesie- O./U.-Kiefer, Leitungsanästhesie- Größe 30/42- G 27 x 1, Ø 0,40 x 40 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) in den so eröffneten Markraum eingeführt und mit dieser das Femur im Bereich des Hüftgelenks durchstoßen. (Abb. 4.4). Über diese Kanüle wurde dann der Wolfram-Führungsdraht (0,2 mm Durchmesser) in den Markraum eingebracht (Abb. 4.5).

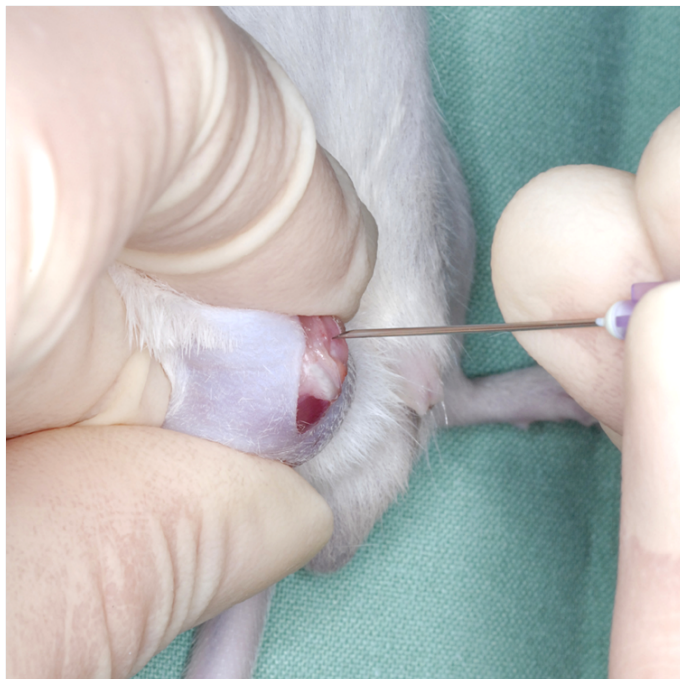
Die Lage des Drahtes wurde intraoperativ radiologisch kontrolliert (Röntgenanlage MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA). Anschließend wurde das Femur mit einer Guillotine (Abb. 4.6) frakturiert (Abb. 4.7).

Nach radiologischer Kontrolle der Frakturkonfiguration (Abb. 4.8) wurde zur Fixierung des Bruches die Schraube (vgl. Abschnitt 4.1.3) über den Führungsdraht vom Kniegelenk her in das Femur eingebracht. (Abb. 4.9). Sobald die Schraube fest im Knochen verankert war, wurde sie am Schraubenkopf an der Sollbruchstelle abgebrochen (Abb. 4.10).

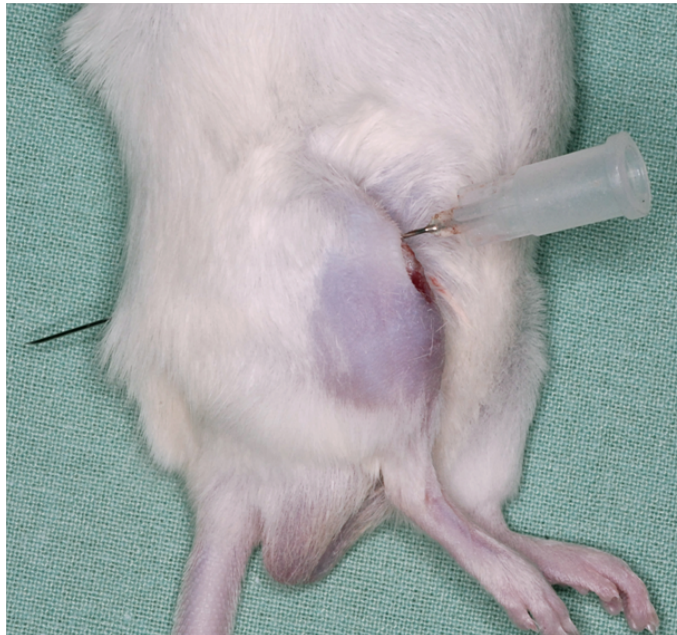
Die Lage der Schraube wurde anschließend röntgenologisch kontrolliert (Abb. 4.11). Abschließend wurde die Patella reponiert und die Kapsel des Kniegelenkes sowie die Haut mit 5-0 Prolene Fäden (Ethicon, Johnson+Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) adaptiert (Abb. 4.12 und Abb. 4.13).



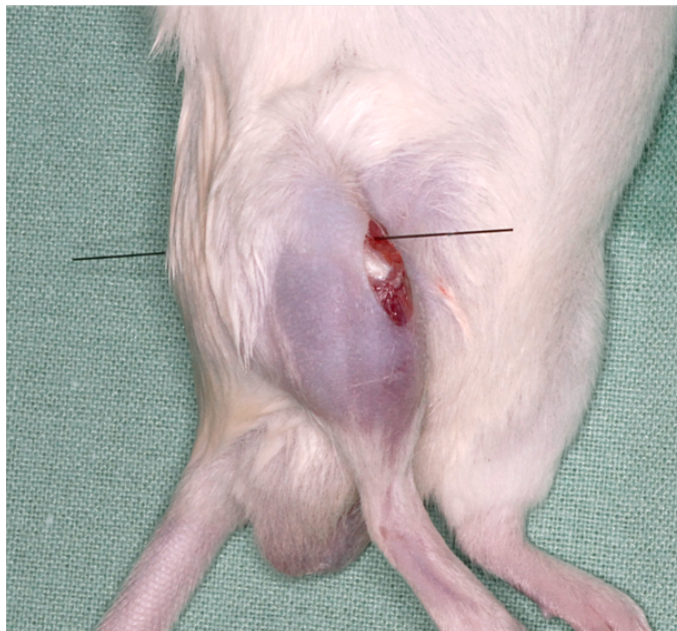
*Abbildung 4.2: Hautschnitt über der Patella*



*Abbildung 4.3: Eröffnen des Markraums mit der Kanüle*



*Abbildung 4.4: Kanüle vor Einbringen des Führungsdrahtes*

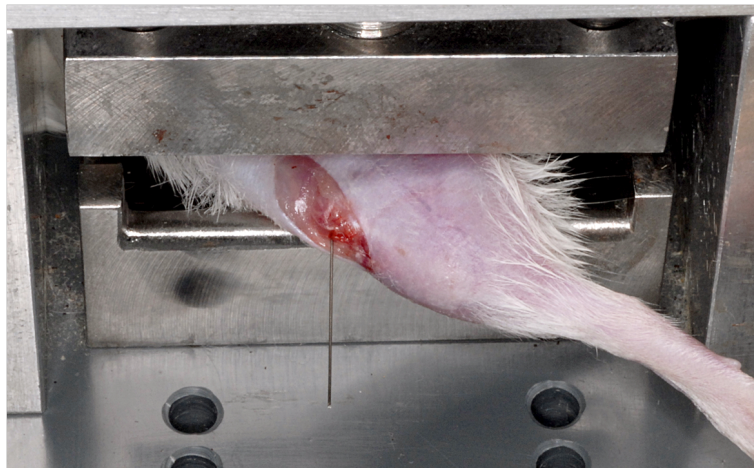


*Abbildung 4.5: Einliegender Führungsdraht nach Entfernen der Kanüle*





*Abbildung 4.6: Guillotine zur Frakturierung des Femur*



*Abbildung 4.7: Platzierung des Femur unter der Guillotine*



*Abbildung 4.8: Radiologische Kontrolle der Frakturkonfiguration*



*Abbildung 4.9: Eindrehen der Schraube*

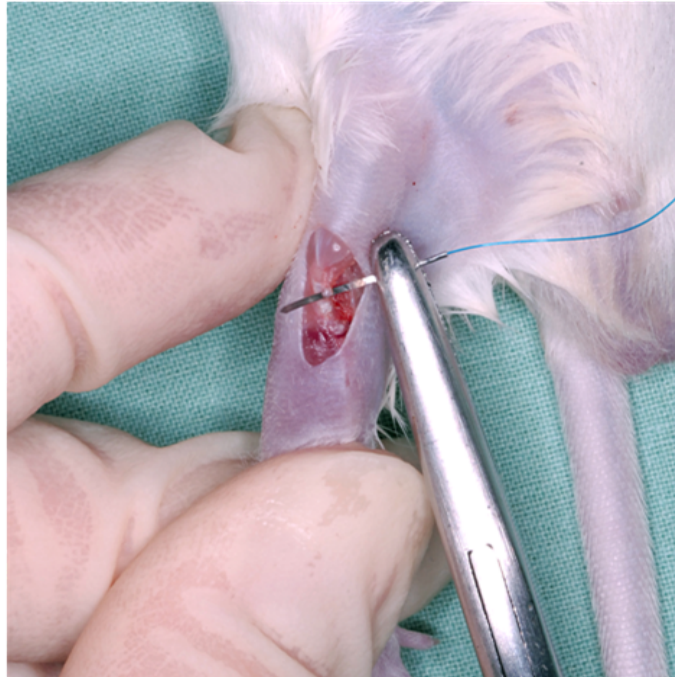


*Abbildung 4.10: Sicht auf die Fossa intercondylaris nach Abbrechen der Schraube an der Sollbruchstelle*



*Abbildung 4.11: Radiologische Kontrolle der Implantatlage*





*Abbildung 4.12: Naht der Kniegelenkscapsel*



*Abbildung 4.13: Adaptation der Haut*

### 4.1.5 Medikamentenapplikation

Zur Schmerztherapie wurde den Tieren intraoperativ sowie am ersten postoperativen Tag 0,25 mg Carprofen (Rimadyl, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in die Nackenfalte s.c. verabreicht.

Über einen Zeitraum von zwei bzw. fünf Wochen wurde den Tieren der Melatoningruppe Melatonin mit einer Dosis von 50 mg/kg/Tag intraperitoneal appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt die entsprechende Menge einer Ethanollösung.

### 4.1.6 Tötung der Tiere

Zwei bzw. fünf Wochen postoperativ wurden die Tiere narkotisiert und geröntgt. Zur weiteren Auswertung wurden die Tiere durch eine Überdosis des Narkotikums getötet.

### 4.1.7 Präparation der Knochen

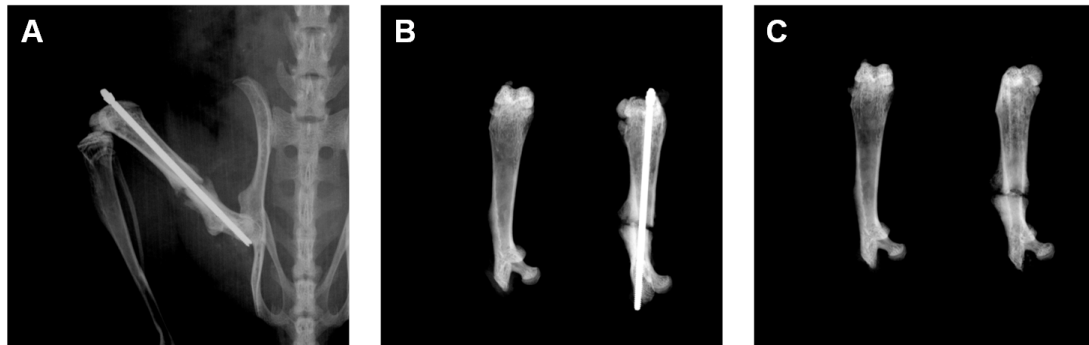
Nach Tötung der Tiere wurden beide Femora, sowohl das operierte als auch das gesunde, explantiert. Dazu wurden die Weichteile sowie Bandstrukturen im Bereich des Knie- und Hüftgelenkes durchtrennt. Nach Exartikulation im Bereich des Knie- und Hüftgelenks wurden die Femora vorsichtig aus dem Weichteilverbund herauspräpariert. Danach wurde das restliche Weichteilgewebe vom Knochen reseziert. Um eine Austrocknung der Knochen zu vermeiden, wurden diese regelmäßig mit isotoner Kochsalzlösung befeuchtet und anschließend in feuchten Kompressen gelagert.

### 4.2 Auswertung

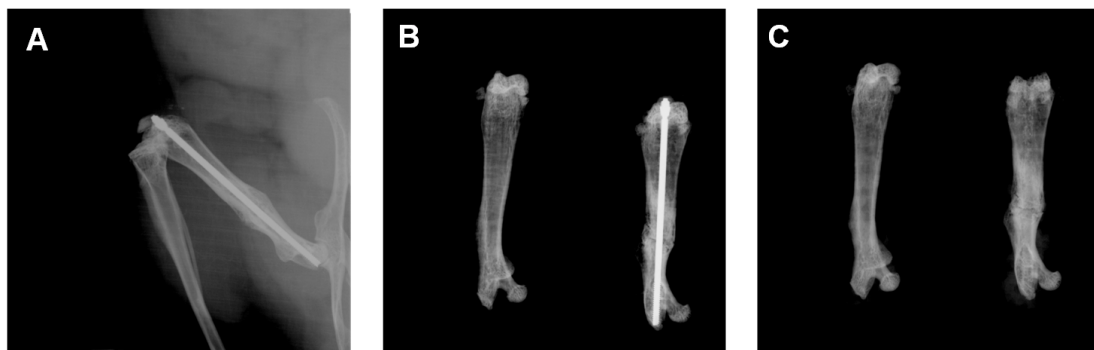
#### 4.2.1 Radiologische Analyse

Zur radiologischen Auswertung wurden digitale dorso-ventrale Röntgenaufnahmen angefertigt (Röntgenanlage MX-20, Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, Illinois, USA).

Insgesamt wurden nach dem jeweiligen Beobachtungszeitraum 3 Aufnahmen angefertigt (Abb. 4.14 und Abb.4.15): vor Ausbau des Femur (A), nach Ausbau mit einliegendem Implantat (B) und nach Entfernung der Schraube (C).



*Abbildung 4.14: Röntgenaufnahme des frakturierten rechten Femur (mit Schraube) vor Ausbau des Knochens (A), nach Ausbau des Knochens (beide Femora) (B) und nach Entnahme der Schraube (C) zwei Wochen nach Fraktur*



*Abbildung 4.15: Röntgenaufnahme des frakturierten rechten Femur (mit Schraube) vor Ausbau des Knochens (A), nach Ausbau des Knochens (beide Femora) (B) und nach Entnahme der Schraube (C) fünf Wochen nach Fraktur*

Die Auswertung mittels Goldberg-Score erfolgte dann am Knochen nach Entfernung der Schraube. Dazu wurde die Frakturheilung mittels Punktesystem bewertet (Goldberg-Klassifizierung) [35]:

- 0 Punkte: keine knöcherne Überbauung
- 1 Punkt : partielle knöcherne Überbauung
- 2 Punkte: komplette knöcherne Überbauung

### 4.2.2 Biomechanische Analyse

Die wesentlichen physiologischen Funktionen eines Knochens sind mit seiner mechanischen Belastbarkeit verknüpft. Deshalb wurde zur Bewertung der Frakturheilung die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften des Femur herangezogen. Mit Hilfe einer zerstörungsfreien 3-Punkt-Biege-Testung wurde die Kallussteifigkeit bestimmt.

#### Messvorrichtung zur biomechanischen Prüfung

Die biomechanische Testung wurde mit einer 3-Punkt-Biege-Messapparatur durchgeführt (Mini-Zwick Z 2.5, Firma Zwick GmbH, Ulm, Deutschland). Die Messapparatur besteht aus einer 20 N-Lastzelle und besitzt zwei Auflagestempel zur Positionierung der Knochen. Über einen weiteren Stempel wird eine Kraft middiaphysär auf den Knochen übertragen (Abb. 4.16).

#### Durchführung der Dreipunktbiegung

Nach Explantation der Femora und Implantatentnahme wurden diese in der 3-Punkt-Biege-Messapparatur getestet. Der Knochen wurde durch Benetzen mit NaCl-Lösung ständig feucht gehalten, um ein Austrocknen über den weiteren Versuchsablauf zu vermeiden. Um standardisierte Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Femora jeweils mit der ventralen Seite nach oben mit einem definierten Abstand der Auflagestempel von 6 mm in der Apparatur positioniert. Unter ansteigender Biegekraft und einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min wurde die



Abbildung 4.16: Apparatur zur 3-Punkt-Biegetestung (Mini-Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland)

Biegesteifigkeit (N/mm) im linearen Abschnitt des Kraft-Weg-Diagramms bestimmt (Abb. 4.17) [42],[109] .

Es wurde makroskopisch und mikroskopisch (histologisch) sichergestellt, dass die applizierte Kraft nicht zu einer Zerstörung des Knochens führte.

Das gesunde Femur wurde als interne Kontrolle verwendet, um individuellen Schwankungen innerhalb der Versuchsgruppen Rechnung zu tragen. Die Biegesteifigkeit wurde deshalb sowohl als Absolutwert in N/mm als auch als Relativwert in Prozent in Relation zur Biegesteifigkeit des gesunden Femur angegeben.

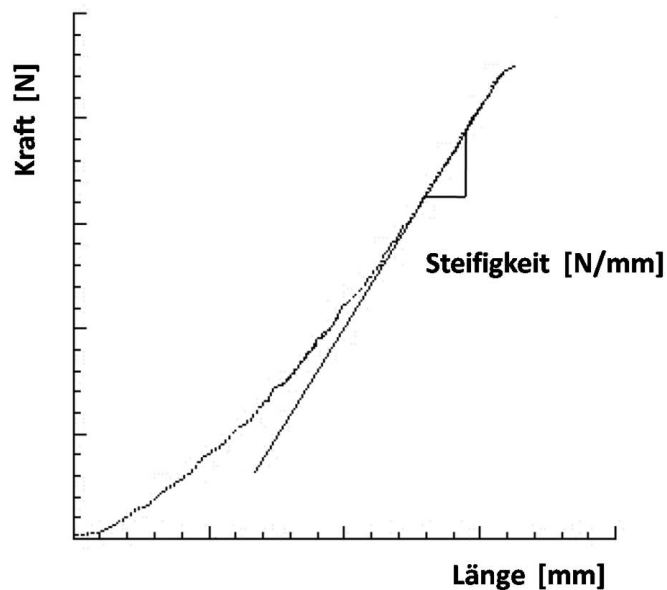


Abbildung 4.17: Skizze eines Kraft-Weg-Diagramms einer Biegetestung mit eingezeichneter Steigung zur Bestimmung der Steifigkeit

### 4.2.3 Histologische Analyse

Die in dieser Arbeit präsentierten histologischen Auswertungen erfolgten an longitudinalen Schnitten von 5  $\mu\text{m}$  Dicke nach Anfärbung mittels Trichrome Masson-Goldner Methode.

#### Gewinnung der Präparate

Zur Analyse der Gewebezusammensetzung des Kallus sowie der Kallusgröße wurden die Knochen histologisch aufbereitet. Dazu wurden die Knochen für 24 Stunden in IHC Zink Fixiermittel (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) fixiert und in 10-prozentiger EDTA-Lösung zwei Wochen lang entkalkt und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden sagittal-longitudinale Schnitte im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers mit einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$  angefertigt.

Zur Visualisierung der verschiedenen Strukturen wurden die Schnittpräparate nach der Trichrome Masson-Goldner Methode angefärbt. Dazu wurden die Proben für zwei Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylinlösung eingelegt, danach für 10 - 15

Minuten unter fließendem Wasser abgespült, dann in Goldner-Lösung I (Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin) für 5 - 10 Minuten gefärbt und kurz mit 1-%-iger Essigsäure abgespült. Danach erfolgte eine Behandlung mit Goldner-Lösung II (Wolframatophosphorsäure-Orange G) bis zur vollständigen Entfärbung des Bindegewebes, gefolgt von einer Spülung mit 1-%-iger Essigsäure und einer 5-minutigen Gegenfärbung mit Goldner-Lösung III (Lichtgrün). Zum Schluß wurde mit 1-%-iger Essigsäure für ca. 5 Minuten ausgewaschen und schließlich mit Ethanol entwässert und aus Xylol mit Xylol-Kitt II (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt. Durch diese Anfärbungen zeigen sich Zellkerne dunkelbraun, Zytoplasma und Muskelfasern rot, Erythrozyten orange und Bindegewebe grün.

### **Histomorphometrische Analyse**

Diese histologischen Schnitte wurden mit einem Mikroskop in 1,25- facher Vergrößerung (Olympus BX60 Mikroskop; Olympos, Tokio, Japan; Zeiss Axio Cam und Axio Vision 3.1; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) digitalisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines automatischen Bildauswertungssystems (ImageJ Analysis System; NIH, Bethesda, Maryland, USA). Folgende Parameter wurden bestimmt:

- BDm : Femurdurchmesser in Höhe des Frakturspaltes [mm]
- CAr : periostale Kallusfläche [mm<sup>2</sup>]
- TOTAr : Fläche des knöchernen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm<sup>2</sup>]
- CgAr : Fläche des knorpeligen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm<sup>2</sup>]
- FTAr : Fläche des bindegewebigen Anteils innerhalb des periostalen Kallus [mm<sup>2</sup>]

In Anlehnung an die von Gerstenfeld et al. [34] vorgeschlagene Auswertung wurden folgende Größen bestimmt:

- periostale Kallusfläche/ Femurdurchmesser [CAr/BDm [mm]],

- knöcherne Kallusfläche/ periostale Kallusfläche [TOTAr/CAR (%)]
- knorpelige Kallusfläche/ periostale Kallusfläche [CgAr/CAR (%)]
- bindegewebige Kallusfläche/ periostale Kallusfläche [FTAr/CAR (%)].

Darüber hinaus wurde die Qualität (Gewebezusammensetzung) der Überbrückung des Frakturspaltes mit einem Punktesystem [31] bewertet. Dazu wurden beide Kortsices unabhängig analysiert, so dass maximal 4 Punkte erreicht werden können:

- 0 Punkte: bindegewebige Überbrückung
- 1 Punkt : knorpelige Überbrückung
- 2 Punkte: knöcherne Überbrückung

### **Immunohistochemische Analyse**

Zur Bestimmung der Osteoklastenanzahl (TRAP-positive Zellen) (Tartrat-resistente saure Phosphatase) wurden die Knochen mit IHC Zink Fixiermittel (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) für 24 Stunden behandelt, anschließend in 10%-iger EDTA-Lösung zwei Wochen lang entkalkt und dann in Paraffin eingebettet. Nach der Entfernung des Paraffin wurden die Schnitte in einer Mischung aus 5 mg Naphotol AS-MX Phosphat und 11 mg schnellem roten TR-Salz in 10 ml 0,2 M Natrium-Azetat-Puffer (pH 5,0) für eine Stunde bei 37 Grad Celsius inkubiert. Die Schnitte wurden mit Methyl Grün gegengefärbt und mit Glyceringelatine eingedeckt.

Für die Untersuchung der Expression des Melatonin-Rezeptors Mel-1a-R im Kallusgewebe wurde Immunfärbung mit monoklonalen Antikörpern verwendet. Dazu wurden Zink-fixierte Schnitte in Paraffin eingebettet, zwei Wochen lang in 10%-iger EDTA-Lösung entkalkt und 5 µm dicke Schichten entnommen. Diese Proben wurden mit x-Tra (Medita Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) entparaffiniert. Nach der Rehydrierung durch eine absteigende Ethanol-Reihe und Antigen-Demaskierung mit 0,05% Saponin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden endogene Peroxidase und unspezifische Bindungsstellen mit 1%  $H_2O_2$  oder 4% Donkey-Normal-



Serum (Dianova, Hamburg, Deutschland) geblockt. Der primäre polyklonale Ratten Anti-Melatonin-Rezeptor-Antikörper Mel-1A-R (1:50; R-18, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) wurde bei 4 Grad Celsius über Nacht inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Donkey-Anti-Ratten-IgG Antikörper (1:100; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 3,3 Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurde als Chromogen für die Enzymreaktion benutzt. Zellkerne wurden gegengefärbt mit Mayers Hemalaun. Nach Dehydrierung mit Ethanol und x-Tra wurden die Schnitte mit x-Tra-Kit (Meditate Medizintechnik) überzogen.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop mit einer 400-fachen Vergrößerung. Innerhalb der 30 definierten High-Power-Fields (Abb. 4.18) wurde die Anzahl der TRAP-positiven Zellen bestimmt.

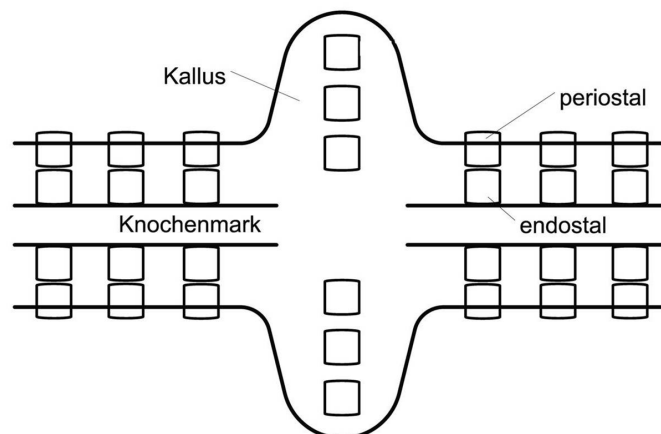


Abbildung 4.18: Schematische Darstellung der definierten high power fields

### 4.2.4 Western Blot -Analyse

Die Bestimmung der Proteinexpression in Gewebeproben kann mit der sogenannten Western-Blot-Analyse durchgeführt werden. Dabei werden die verschiedenen Proteine zunächst mittels Gelelektrophorese getrennt. Mit einer weiteren horizontalen Elektrophorese werden die Proteine einer jeweiligen Bande vom Gel auf eine

OPG	Inhibitor der Osteoklastogenese
RANKL	Stimulator der Osteoklastogenese
Kollagen I	Knochenformationsmarker
PCNA	Zellproliferationsmarker

Tabelle 4.2: Analytierte Proteine

Protein-bindende Membran übertragen (englisch blotting). Dort können sie durch Färbung mit einem konjugierten Antikörper markiert werden. Das Ausmaß der Proteinexpression wird schließlich durch eine Licht emittierende Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen, wobei das Licht mit einem Röntgenfilm detektiert wird.

In dieser Arbeit wurde die Proteinexpression von OPG (Osteoprotegerin), RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ -B Ligand), Kollagen I und PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) analysiert (Tabelle 4.2).

Folgende Präparationsschritte wurden durchgeführt:

Das Kallusgewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}$  aufbewahrt. Zur Proteinextraktion und Western Blot-Analyse von OPG, RANKL, Kollagen I und PCNA wurde das Kallusgewebe in Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02%  $\text{NaN}_3$ , 0,2 mM PMSF und Protease Inhibitor Cocktail (1:100 vol/vol; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) ) homogenisiert, 30 Minuten lang auf Eis inkubiert und 30 Minuten lang bei  $16000 \times g$  zentrifugiert. Proteinkonzentrationen wurden nach Lowry bestimmt. Alle Proteinextrakte (10  $\mu\text{g}$  Protein pro Bande) wurden diskontinuierlich in Natrium- Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelen getrennt und auf Polyvinylendifluorid-Membrane transferiert. Nach der Blockade von nicht-spezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen für 4 Stunden mit den folgenden Antikörpern inkubiert: Maus-Antimaus-PCNA (1:500; DAKO, Hamburg, Deutschland), Kaninchen- Antimaus OPG (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), Kaninchen-Antimaus- cleaved Caspase-3 (1:400; Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland), Kaninchen- Antimaus RANKL (1:300; Abcam; Cambridge;UK) und Ziege- Antimaus-Kollagen I (1:75; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland).

Danach erfolgte eine Behandlung mit korrespondierenden Meerrettichperoxidase konjugierten sekundären Antikörpern (1,5 Stunden; 1:5000; GE Healthcare Amersham, Freiburg, Deutschland). Die Protein-Expression wurde mit Luminol-

verstärkter Chemolumineszenz (ECL, GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, Great Britain) sichtbar gemacht. Die Signale wurden densitometrisch erfasst (Quantity One, Geldoc, BioRad, München, Deutschland) und auf Beta-Actin-Signale normiert (1:5000, Maus-Anti-Beta-Aktin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), um bezüglich ungleicher Beladung zu korrigieren.

### 4.3 Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) angegeben. Nach Überprüfung der Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Varianzgleichheit (F-Test) wurden die experimentellen Gruppen mittels Student-t-Test analysiert. Die statistischen Untersuchungen wurden mit der Graph-Pad Prism 4.0 Software (Graphpad, Dan Diego, California, USA) erstellt. Es wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  festgelegt, um signifikante Unterschiede anzuzeigen.

# Kapitel 5

## Ergebnisse

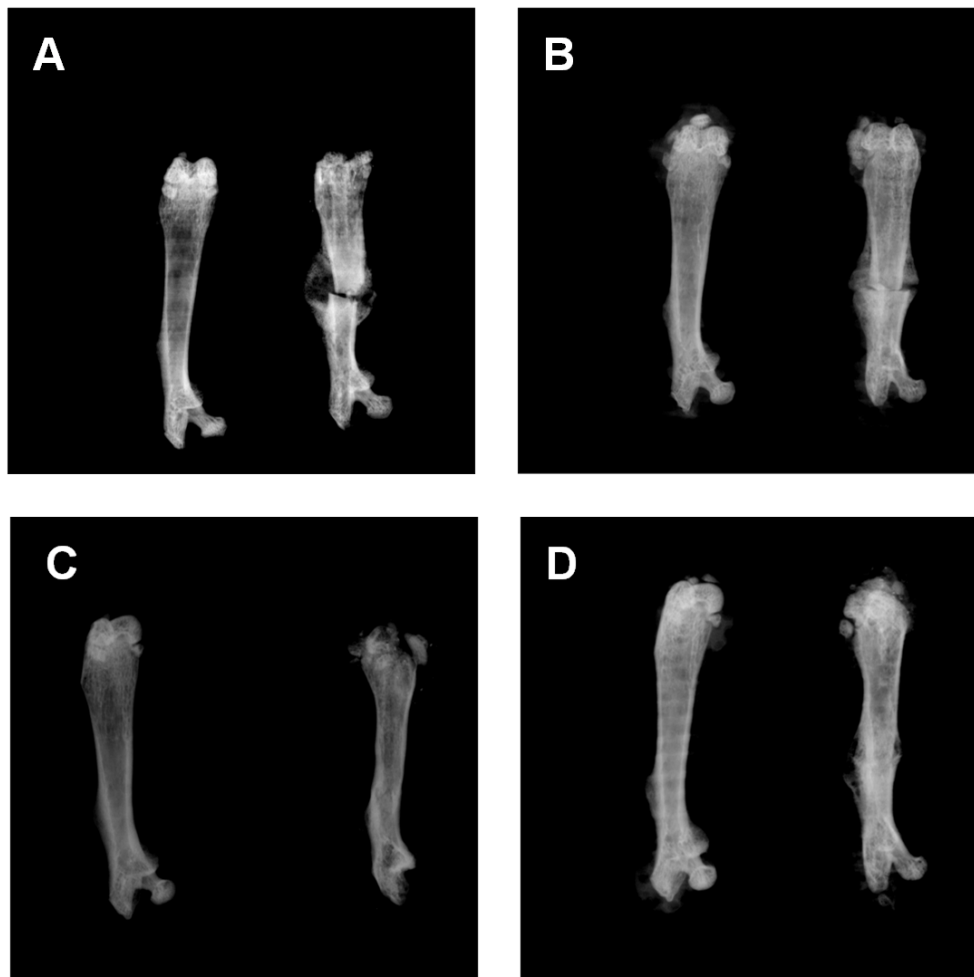
Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der radiologischen, der biomechanischen und der histomorphometrischen Untersuchungen sowie der Proteinexpressionsanalyse vorgestellt.

### 5.1 Radiologie

Die radiologische Auswertung erfolgte anhand der digitalisierten Röntgenbilder zwei Wochen bzw. fünf Wochen nach Fraktur (Abb. 5.1).

Zwei Wochen postoperativ zeigte sich sowohl nach der Behandlung mit Melatonin als auch in der Kontrollgruppe eine partielle knöcherne Überbauung mit einem Goldberg-Score von  $1,0 \pm 0,0$  in beiden Gruppen (Abb. 5.2).

Im weiteren Heilungsverlauf fünf Wochen postoperativ zeigte sich eine zunehmende knöcherne Überbauung. Der Goldberg-Score war mit  $1,8 \pm 0,2$  versus  $2,0 \pm 0,0$  in beiden Gruppen vergleichbar (Abb. 5.2). Die Unterschiede waren somit zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant.



*Abbildung 5.1: Röntgenbilder des frakturierten und des gesunden Femur eines Tieres der Kontrollgruppe zwei Wochen postoperativ (A), der Melatoningruppe zwei Wochen postoperativ (B), der Kontrollgruppe fünf Wochen postoperativ (C) und der Melatoningruppe fünf Wochen postoperativ (D). Die Frakturen nach zwei Wochen zeigten eine partielle knöcherne Überbauung (Goldberg-Score = 1), nach fünf Wochen eine vollständige knöcherne Überbauung (Goldberg-Score = 2)*

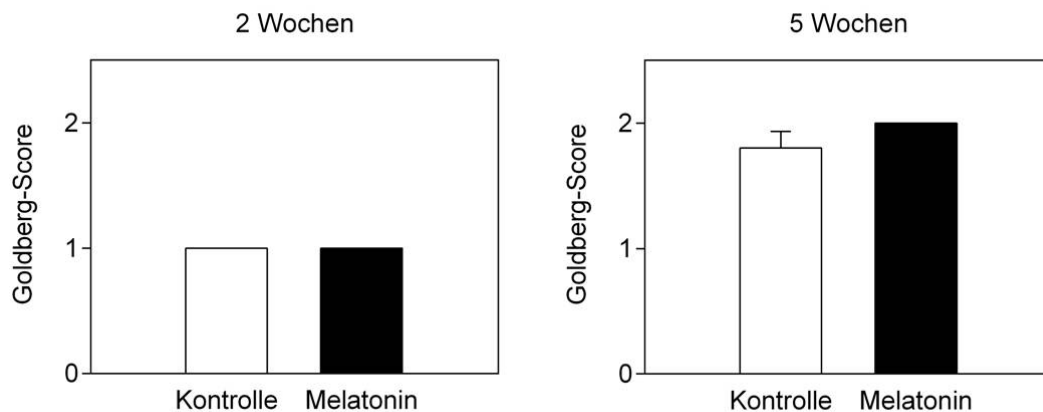


Abbildung 5.2: Goldberg-Score zur radiologischen Beurteilung der Frakturheilung der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ : 0 = keine knöcherne Überbrückung, 1 = partielle knöcherne Überbrückung, 2 = komplette knöcherne Überbrückung; Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM

## 5.2 Biomechanik

Die Biegesteifigkeit der Knochen wurde mittels 3-Punkt-Biegung bestimmt, vgl. Abschnitt 4.2.2.

Zur Berücksichtigung individueller Unterschiede der Knochen zwischen den einzelnen Versuchstieren wurde die Biegesteifigkeit sowohl am geheilten als auch am gesunden Knochen bestimmt (rechtes und linkes Femur). Die Messwerte sind als Absolutwerte (N/mm) sowie als Relativwerte zum gesunden Knochen in Prozent angegeben.

Zwei Wochen postoperativ wurden in der Melatoningruppe Werte von minimal 1,2 N/mm bis maximal 8,5 N/mm gemessen. In der Kontrollgruppe wurden Werte bis maximal 39,7 N/mm ermittelt. Die Biegesteifigkeit war nach der Behandlung mit Melatonin signifikant ( $p < 0.05$ ) geringer als in der Kontrollgruppe ( $3,9 \pm 0,6$  N/mm vs.  $9,5 \pm 3,7$  N/mm) (Abb. 5.3).

Vergleichbare Ergebnisse wurden für die relative Biegesteifigkeit in Prozent ermittelt. Die Tiere, die mit Melatonin behandelt wurden, erreichten eine relative Biegesteifigkeit von im Mittel  $5,4 \pm 1,0$  %. Dieser Messwert war signifikant niedriger als der der Kontrollgruppe mit einer Biegesteifigkeit von durchschnittlich  $15,8 \pm 5,0$  %

## 5 ERGEBNISSE

(Abb. 5.4).

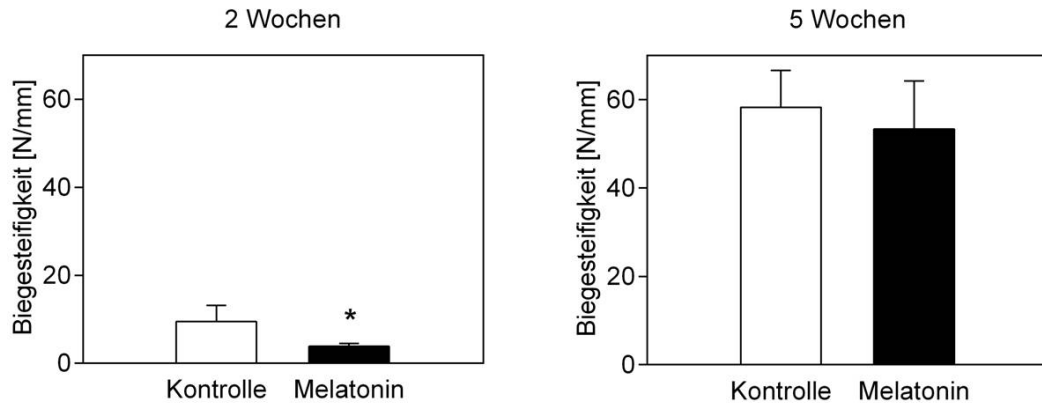


Abbildung 5.3: Absolute Biegesteifigkeit der Knochen der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  relativ zur Kontrollgruppe

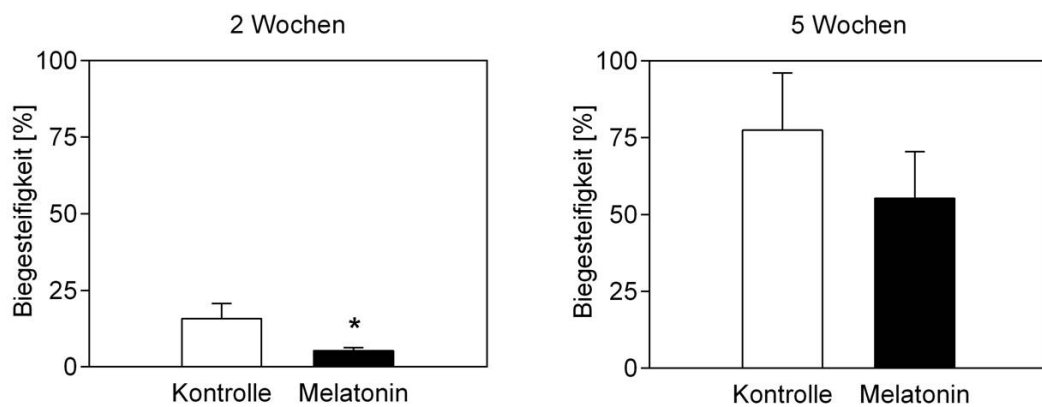


Abbildung 5.4: Relative Biegesteifigkeit der Knochen der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  relativ zur Kontrollgruppe

Fünf Wochen postoperativ wurden entsprechend dem fortgeschrittenen Heilungsprozess deutlich höhere Werte für die Biegesteifigkeit ermittelt. In der Melatoningruppe wurde eine niedrigere Biegesteifigkeit von minimal 12,7 N/mm bis maximal 103,5 N/mm gemessen im Vergleich zur Kontrollgruppe (23,5 N/mm bis 116,3 N/mm) (Abb. 5.3).

Auch die relative Biegesteifigkeit war mit  $55,3 \pm 15,2$  % für die Melatonin-behandelten Tiere geringer als die der Kontrollgruppe mit einem Mittelwertwert von  $77,4 \pm 18,6$  % (Abb. 5.4). Insgesamt zeigten die Melatonin-behandelten Tiere nach fünf Wochen also eine geringere Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe, aber der Unterschied war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

### 5.3 Histologie

Die Gewinnung der histologischen Knochenpräparate ist in Abschnitt 4.2.3 beschrieben. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte an longitudinal-sagittalen Schnittpräparaten. Alle Knochen heilten im Sinne einer sekundären Frakturheilung mit einer deutlichen Kallusbildung mit Anteilen intramembranöser und endochondraler Ossifikation. Nach der von Gerstenfeld et al. (Gerstenfeld u. a., 2005) vorgeschlagenen Nomenklatur wurden die Knochenfläche (TOTAr; total osseous tissue area), die Knorpelfläche (CgAr; cartilaginous area), die Bindegewebe-*fläche* (FTAr; fibrous tissue callus area), die Gesamt-Kallusfläche (CAr; callus area) und der Femurdurchmesser (BDm; bone diameter) bestimmt. Um eventuellen Differenzen in der Femurgröße zwischen den einzelnen Versuchstieren Rechnung zu tragen, wurde die Kallusfläche zusätzlich in Relation zu dem jeweiligen Femurdurchmesser im Frakturbereich quantifiziert. Zusätzlich wurden die relativen Anteile von Knochen (TOTAr/CAr), Knorpel (CgAr/CAr) und Bindegewebe (FTAr/CAr) in Relation zur Gesamt-Kallusfläche bestimmt. Darüber hinaus wurde die Qualität (Gewebezusammensetzung) der Überbauung des Frakturspaltes mit einem Punktesystem [31] bewertet.

Zwei Wochen postoperativ waren die Gesamt-Kallusflächen beider Gruppen vergleichbar. In der Melatonin-Gruppe wurde für das Verhältnis von Gesamt-Kallusfläche zu Femurdurchmesser ein Wert von  $4,7 \pm 0,8$  mm ermittelt. Die Kontrollgruppe wies eine Gesamt-Kallusfläche von  $5,4 \pm 0,8$  mm auf (Abb. 5.5). Fünf Wochen postoperativ zeigte sich in den mit Melatonin behandelten Tieren mit  $5,5 \pm 0,8$  mm ein signifikant größerer Betrag ( $p < 0,04$ ) im Vergleich zum Wert von  $3,1 \pm 0,7$  mm zur Kontrollgruppe (Abb. 5.5). Dies spricht für einen verzögerten Remodelingprozess bei der Behandlung mit Melatonin.

Die Gewebeanalyse der Frakturzone ergab einen geringeren Punktwert nach Be-



## 5 ERGEBNISSE

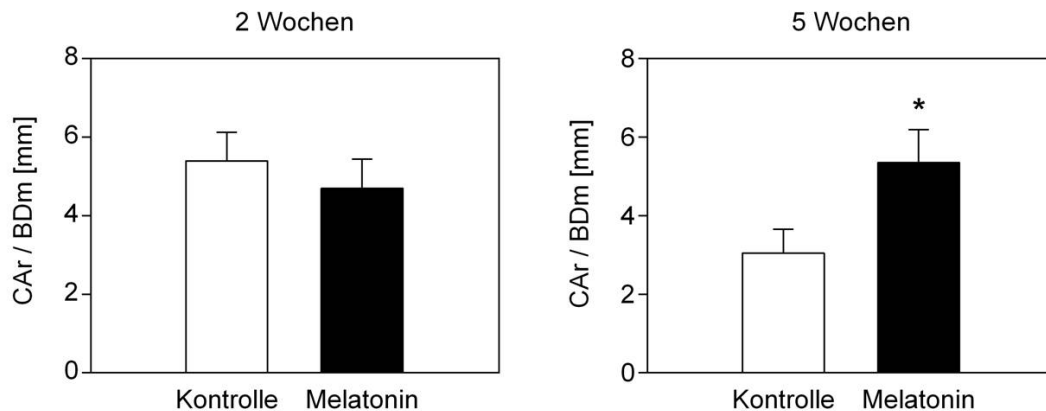


Abbildung 5.5: Histomorphometrische Analyse der Gesamt-Kallusfläche (CAr) im Verhältnis zum Durchmesser des Femur (BDm) in mm der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  relativ zur Kontrollgruppe

handlung mit Melatonin im Vergleich zur Kontrolle. Fünf Wochen postoperativ erreichten beide Gruppen einen vergleichbaren Punktwert (Abb. 5.6).

Die Analyse der Kalluszusammensetzung zeigte sowohl nach zwei Wochen als auch nach fünf Wochen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5.7, Abb. 5.9, Abb. 5.8). Zwei Wochen postoperativ war nach Gabe von Melatonin der Anteil an Knochen erniedrigt ( Melatonin:  $60 \pm 3 \%$ , Kontrolle:  $88 \pm 4 \%$  ) und der Anteil an Knorpel im Verleich zur Kontrolle erhöht ( Melatonin:  $27 \pm 3 \%$ , Kontrolle:  $19 \pm 4 \%$  ). Fünf Wochen postoperativ war der Knochenanteil in beiden Gruppen vergleichbar und erreichte nahezu 90% (Abb. 5.7). Knorpelgewebe war im Frakturkallus kaum mehr nachweisbar (Abb. 5.9). Der Bindegewebsanteil war in beiden Gruppen unter 10% und unterschied sich nicht signifikant (Abb. 5.8).

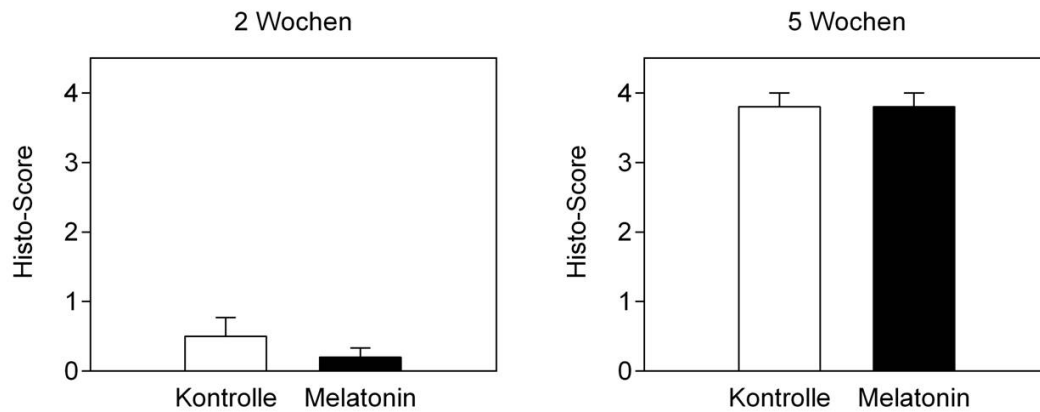


Abbildung 5.6: Gewebezusammensetzung des Frakturspaltens der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Beide Cortices wurden folgendermaßen bewertet: 0 Punkte: bindegewebige Überbrückung, 1 Punkt: knorpelige Überbrückung, 2 Punkte: knöcherner Überbrückung. Es wurde die Summe für beide Cortices betrachtet (maximal 4 Punkte). Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM

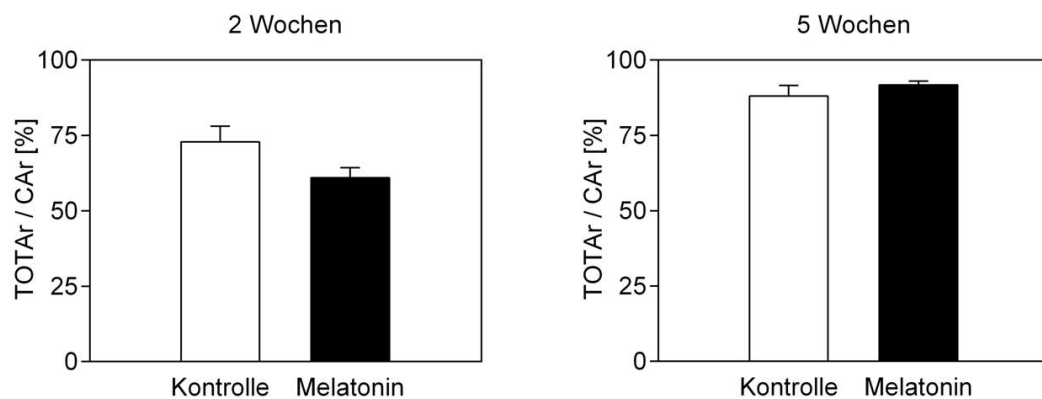


Abbildung 5.7: Anteil an Knochengewebe im Kallus relativ zur Gesamt-Kallusfläche der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM

## 5 ERGEBNISSE

---

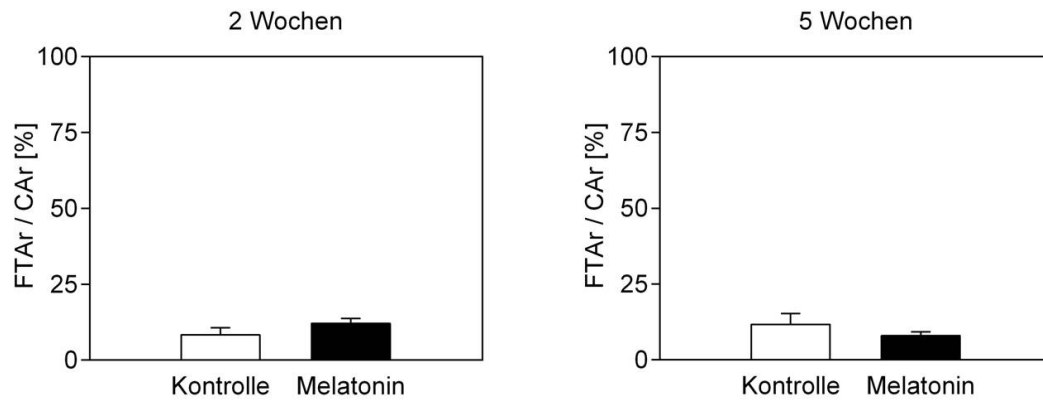


Abbildung 5.8: Anteil an Bindegewebe im Kallus relativ zur Gesamt-Kallusfläche der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM

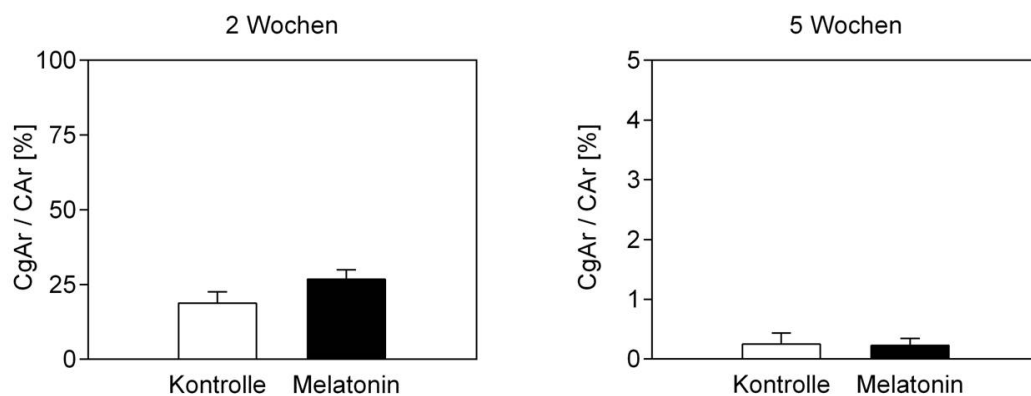


Abbildung 5.9: Anteil an Knorpelgewebe im Kallus relativ zur Gesamt-Kallusfläche der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM

Die Durchführung der immunhistochemischen Analyse ist in Abschnitt 4.2.3 beschrieben.

Die immunhistochemischen Analysen zwei Wochen postoperativ zeigten, dass die Behandlung mit Melatonin zu einer signifikanten Abnahme der Osteoklasten im Frakturkallus führt (Melatonin:  $1,5 \pm 0,2$  pro HPF, Kontrolle:  $4,2 \pm 0,8$  pro HPF) (Abb. 5.10).

Die TRAP-positiven Osteoklasten wurden hauptsächlich innerhalb der zentralen Region des Kallus nachgewiesen (Abb. 5.11 A). Im Gegensatz dazu konnten TRAP-positive Zellen im Periost und in der endostalen Region des Kallus nicht nachgewiesen werden.

Immunfärbungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Mel-1a-R zeigten, dass Osteoblasten innerhalb des Kallus zur Expression von Melatonin-Rezeptoren in der Lage sind (Abb. 5.11 B). Die negative Kontrolle zeigte keine positiv gefärbten Zellen.

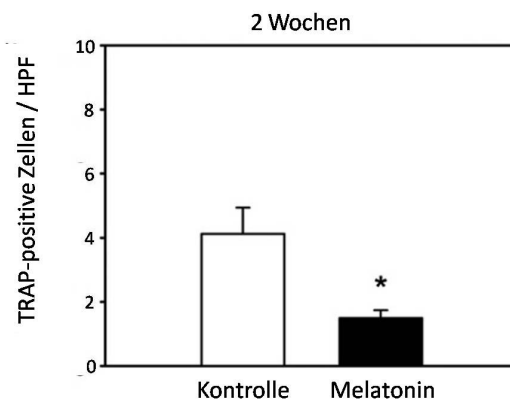


Abbildung 5.10: Anzahl der TRAP-positiven Zellen pro HPF (High Power Field ; vgl. Abschnitt 4.2.3) im Frakturkallus der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  versus der Kontrollgruppe

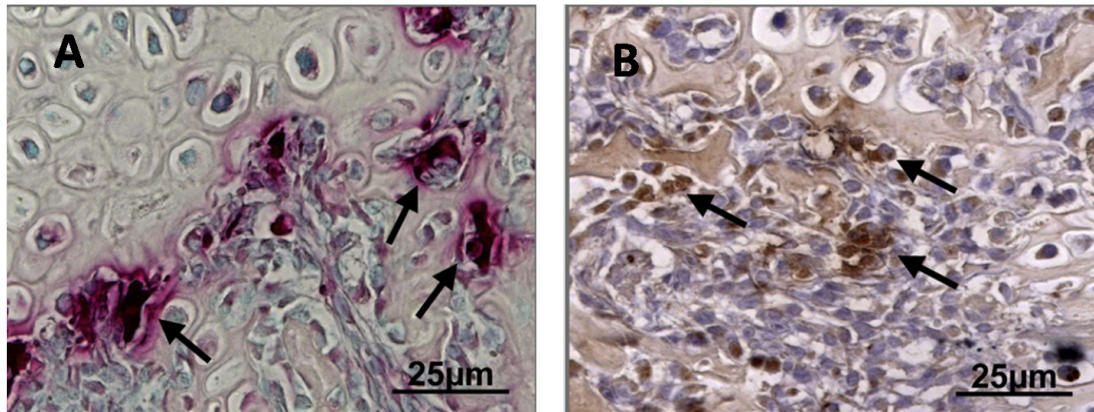


Abbildung 5.11: Immunhistochemische Färbung TRAP-positiver Zellen (A), sowie Mel 1aR Expression (B) innerhalb des Frakturkallus zwei Wochen postoperativ

### 5.4 Western Blot

Die Durchführung der Protein-Expressions-Analyse (Western Blot-Analyse) ist in Abschnitt 4.2.4 beschrieben. Es wurde die Expression von OPG, Kollagen I, RANKL und PCNA untersucht (Abb. 5.12). Die gemessenen optischen Dichten der Proben wurden auf die Dichte von  $\beta$ -Aktin als Referenzprobe korrigiert.

Zwei Wochen postoperativ konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden, dass die Expression von OPG, ein Inhibitor der Osteoklastogenese, nicht durch die Melatonin-Behandlung beeinflusst wurde (Abb. 5.13). Die Expression von RANKL, ein wesentlicher Faktor für die Osteoklasten-Bildung und -Aktivität, war nach Gabe von Melatonin signifikant erniedrigt (Abb. 5.13).

Die Expression von Kollagen I, einem Marker der Osteoblastogenese, war ebenfalls nach Melatonin-Behandlung signifikant vermindert (Abb. 5.13). Die Expression von PCNA war hingegen nur geringfügig erniedrigt. (Abb. 5.13).

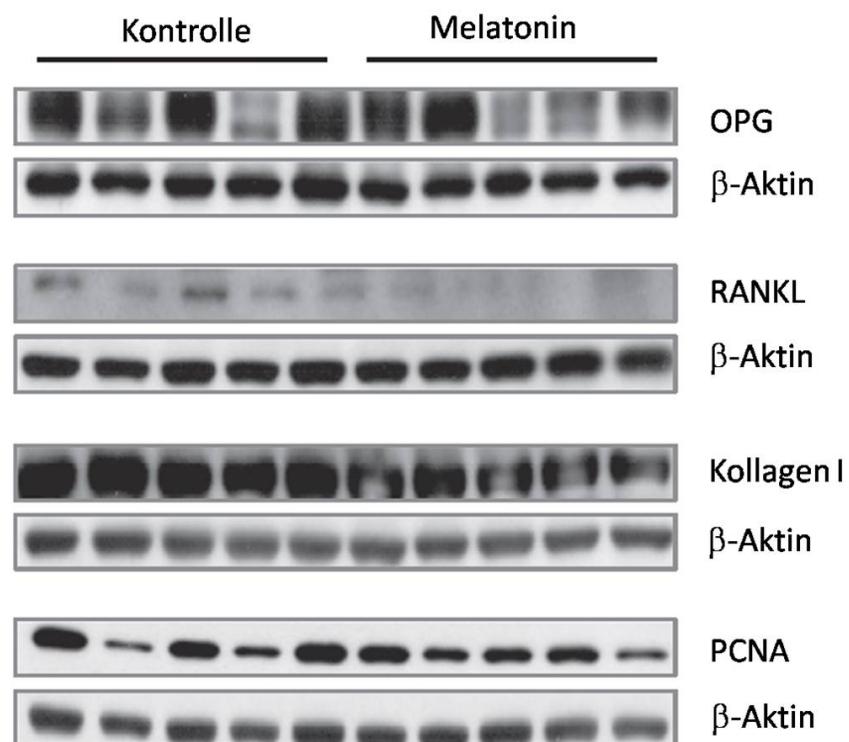


Abbildung 5.12: Western Blot Analyse von OPG, RANKL, Kollagen I und PCNA im Kallusgewebe.  $\beta$ -Aktin dient der densitometrischen Normierung

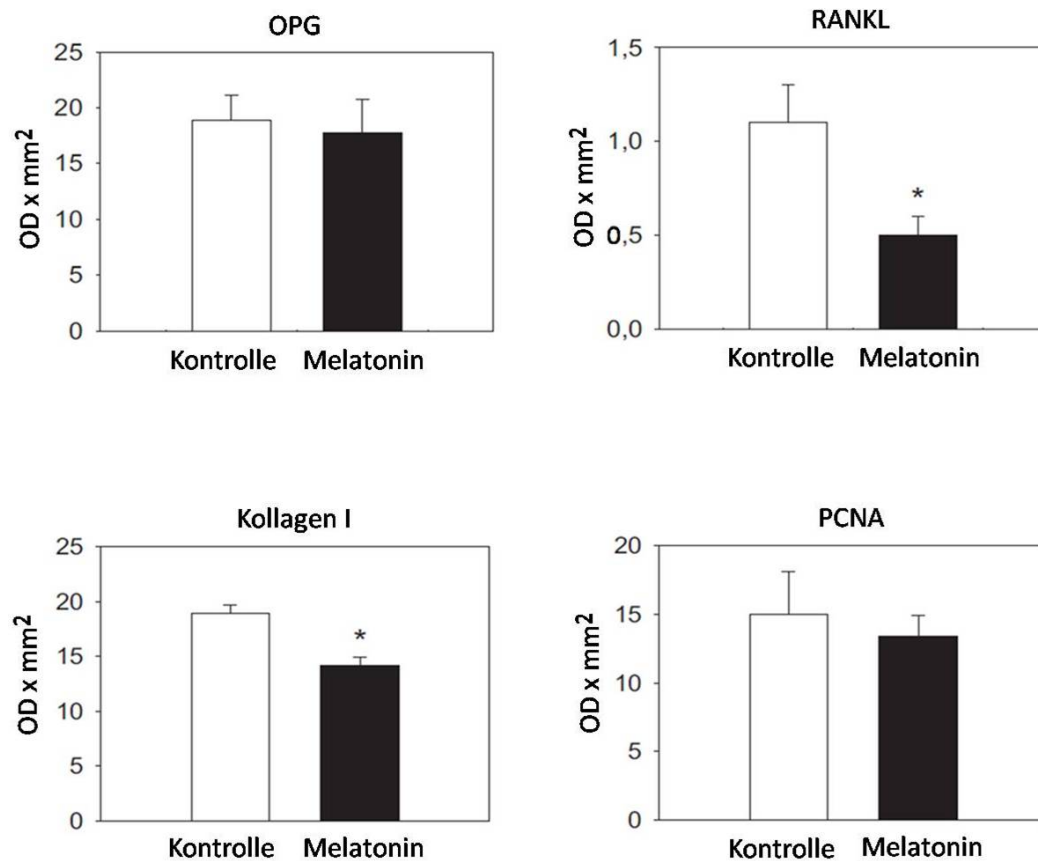


Abbildung 5.13: Western Blot Analyse von OPG, RANKL, Kollagen I und PCNA im Kallusgewebe der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert  $\pm$  SEM ; \*  $p < 0,05$  versus der Kontrollgruppe

# Kapitel 6

## Diskussion

### 6.1 Diskussion der Methoden

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Melatonin auf die Frakturheilung untersucht werden. Da in-vitro-Untersuchungen aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit und des komplizierten Zusammenspiels der verschiedenen Frakturphasen nur wenig aussagekräftig sind [28], wurden die Untersuchungen in einem Tiermodell vorgenommen. Obwohl Großtiermodelle wie z.B. Schafe den Vorteil besitzen, dass sie mit der Anatomie des Menschen sehr gut vergleichbar sind und somit verschiedene Osteosynthesetechniken ohne größeren technischen Aufwand in diese Tiermodelle übertragen werden können, wurden die Untersuchungen im Mausmodell durchgeführt. Entscheidend ist, dass das Genom der Maus bereits bekannt ist und dadurch eine Vielzahl verschiedener Antikörper oder transgener Stämme zu Verfügung stehen, um die molekulargenetischen Mechanismen der Frakturheilung zu untersuchen. Zudem können Untersuchungen aufgrund der geringen Zucht- und Haltungskosten an Mäusen kostengünstig durchgeführt werden. Dies erlaubt z.B. die Untersuchung großer Gruppengrößen und damit valide Aussagen bezüglich der Ergebnisinterpretation [41], [81].

Obwohl die Maus kein Havers-System besitzt, zeigt der Heilungsvorgang über sogenannte Resorptionshöhlen Analoga zum Remodeling über das Havers-System beim Menschen [78]. Dennoch muss die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen immer kritisch diskutiert werden.



Um standardisierte Untersuchungen am Mausmodell durchzuführen, ist ein geeignetes Tiermodell unumgänglich. Es existieren verschiedene Frakturmodelle an unterschiedlichen Knochen und auch verschiedene Methoden der osteosynthetischen Stabilisierung [41]. Am besten geeignet sind die langen Röhrenknochen wie die Tibia und das Femur [40]. Im Vergleich zur Tibia hat das Femur einen größeren und vor Allem homogenen Durchmesser und vereinfacht damit die Stabilisierung der Fraktur. Gerade vor dem Hintergrund, dass die biomechanischen Eigenschaften der Implantate einen enormen Einfluss auf den Frakturheilungsprozess haben, sind standardisierte Untersuchungsbedingungen eine Grundvoraussetzung für Studien am Tiermodell [41], [19].

Grundsätzlich unterscheidet man offene und geschlossene Frakturmodelle. Bei offenen Frakturmodellen wird der Knochen über einen lateralen Zugang freipräpariert und unter Sicht osteotomiert. Durch die Verwendung eines Fixateurs [100] oder einer Platte [67] kann dadurch der Knochen stabil versorgt werden. So konnte am hiesigen Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie nachgewiesen werden, dass eine rigide Stabilisierung mittels Plattenosteosynthese eine intramembranöse Heilung induziert, die im Gegensatz zu einer enchondralen Heilung ohne die Bildung von Knorpelgewebe und einer Kallusmanschette abläuft [42]. Nachteil ist jedoch, dass offene Operationsverfahren anspruchsvoller sind, einen hohen Zeitaufwand erfordern und einen größeren Weichteilschaden erzeugen als geschlossene Frakturmodelle. Vor Allem der Weichteilschaden kann die Frakturheilung beeinträchtigen und zu einer verzögerten Frakturheilung führen [20].

Als geschlossene Frakturmodelle wurden früher häufig einfache Kanülen, sogenannte "Pins" verwendet. Diese können zwar geschlossen in den Knochen eingebracht werden, wurden aber durch die Frakturierung des Knochens verbogen, was die Frakturheilung maßgeblich beeinflussen kann. Zudem gewährleistet diese Art der Stabilisierung keine Rotationsstabilität [68], [43].

In dieser Arbeit wurde das am hiesigen Institut etablierte Modell der Schraubenosteosynthese verwendet [48], [41]. Das Implantat basiert auf dem Prinzip einer Zugschraube. Durch das proximale Gewinde und den distalen konischen Kopf kann die Fraktur komprimiert und rotationsstabil versorgt werden [47]. Vor der Frakturierung wird durch eine Kanüle ein Führungsdraht in das Femur eingebracht, so dass erst nach der Frakturierung die Schraube über diesen Draht platziert wird. Zudem hat das gewählte Modell den Vorzug, dass die geschlossene Fraktur-

rung und die Implantateinbringung nur zu einem geringen Weichteilschaden führen [47]. Die Frakturierung des Femur und die Implantation der Schraube konnten reproduzierbar in gleicher Qualität durchgeführt werden. Die Versuchstiere zeigten postoperativ nach 2-4 Tagen einen physiologischen Bewegungsablauf.

Die Untersuchung der Frakturheilung wurde nach zwei und fünf Wochen postoperativ durchgeführt. Die Wahl dieser Zeitpunkte wurde in Anlehnung an die Untersuchungen von Manigrasso und O'Connor gewählt [68], die in einem Marknagelmodell den Zeitverlauf der Frakturheilung bei der Maus an neun verschiedenen Zeitpunkten nach der Frakturierung untersucht haben. Die Knochenregeneration verläuft bei der Maus sehr viel schneller als beim Menschen. Bei der Maus ist nach ca. 10 bis 14 Tagen die maximale Kallusgröße erreicht. Nach ca. fünf Wochen ist die Fraktur weitestgehend knöchern konsolidiert [68]. In dieser Arbeit wurde deshalb als Zeitpunkt der frühen Frakturheilungsphase zwei Wochen postoperativ und als Zeitpunkt der späten Frakturheilungsphase fünf Wochen postoperativ gewählt.

Mittels Röntgenaufnahmen wurde die knöcherne Überbauung beurteilt. Die Auswertung erfolgte nach Ausbau der Knochen sowie der Implantate so, dass der Frakturspalt hinsichtlich der knöchernen Überbrückung mittels Punktesystem bewertet werden konnte.

Zur Beurteilung der Stabilität des Frakturkallus stehen verschiedene biomechanische Messmethoden wie die 3-Punkt-Biegetestung bzw. 4-Punkt-Biegetestung oder die Messung der Rotationsstabilität zur Verfügung [41]. Der Vorteil einer 4-Punkt-Biegetestung liegt in einer gleichmäßigeren Verteilung der einwirkenden Kraft auf den Knochen im Gegensatz zur 3-Punkt-Biegung, bei der die Kraft auf einen Punkt zentriert ist [15]. Da eine 4-Punkt-Biegung aufgrund der geringen Größe des Mäusefemur nicht realisierbar war, wurde hier das Verfahren der 3-Punkt-Biegung verwendet. Um reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Knochen immer in gleicher Art und Weise in der Testapparatur positioniert. Die Biegetestungen wurden zerstörungsfrei durchgeführt, sodass die Knochen anschließend für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen. Damit konnte die Zahl der benötigten Versuchstiere deutlich reduziert werden.

Zur weiteren Beurteilung der Frakturheilung wurden histomorphometrische Untersuchungen des Kallusgewebe durchgeführt [34]. Gemäß der Empfehlungen der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) wurden in longitudinalen Schnitten durch den Frakturkallus verschiedene Parameter ermittelt [87].

Diese Parameter gaben u.a. Aufschluss über die verschiedenen Gewebeanteile im Frakturkallus, die eine Beurteilung der Frakturheilungsphasen ermöglichen. Dabei unterscheidet man hauptsächlich Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe. Während in der frühen Phase überwiegend knorpeliges Gewebe mit einem großen Kallusdurchmesser vorliegt, findet man in der späten Frakturphase überwiegend knöchernes Gewebe, das bei zunehmender Heilung für die Stabilität des Knochens verantwortlich ist.

Zur Untersuchung des Einflusses von Melatonin auf die Osteoklasten wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Anhand der Anzahl TRAP-positiver Zellen konnte somit die Wirkung auf die Knochenresorption beurteilt werden. Durch Immunfärbung mit einem monoklonalen Antikörper wurde die Expression des Melatoninrezeptors (Mel-1a) im Frakturkallus nachgewiesen. Weiterhin wurde mittels Western Blot-Analyse die Proteinexpression von OPG, RANKL, Kollagen I und PCNA bestimmt. Die verwendeten Untersuchungsmethoden sind standardisierte Verfahren.

Die gewählte tägliche Dosis an Melatonin beträgt 50 mg/kg Körpergewicht. Übliche Dosen beim Menschen liegen zwischen 0,01 mg/kg bei Anwendungen als Schlafmittel und 1 mg/kg zur Regulierung der Östrogenproduktion [58]. Die höhere Dosis wurde gewählt, da in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass durch die Gabe vergleichbarer Dosen die Knochendichte [56] sowie der Anteil an kortikalen Knochen [107] erhöht war.

### 6.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorgelegten Arbeit wurde die Wirkung von Melatonin auf die Frakturheilung untersucht. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass Melatonin den Frakturheilungsprozess maßgeblich beeinflusst, was sich in einer signifikant erniedrigten Biegesteifigkeit nach Gabe von Melatonin im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass Melatonin durch Hemmung der Expression von RANKL die Osteoklastenaktivität und damit die Knochenresorption inhibiert.

Eine Vielzahl von Studien konnte jedoch zeigen, dass Melatonin einen positiven Effekt auf die Knochenregeneration hat. So haben Munoz et al.[73] nachgewiesen, dass die topische Anwendung von Melatonin und Wachstumshormonen die Os-

teointegration von Zahnimplantaten beschleunigt. Auch Calvo-Guirado et al [17] konnten eine signifikante Zunahme der Knochennbildung und Knochendichte bei lokaler Anwendung von Melatonin bei Zahnimplantaten an Hunden nachweisen. Die Autoren postulieren daher, dass Melatonin in der Lage ist, die Osseointegration zu verbessern. Zudem konnte eine aktuelle Studie zeigen [95], dass die Gabe von Melatonin in Knochendefekte der Tibia bei Kaninchen nicht nur zu einer besseren Heilung führt, sondern auch die Gefäßdichte im neugebildeten Knochen erhöht.

Die Fähigkeit von Melatonin, die Reifung von Osteoblasten zu beschleunigen, wurde als erstes in Präosteoblasten der Maus nachgewiesen. Dort führten niedrige Konzentrationen von Melatonin zu einer Erhöhung des mRNA- Niveaus von osteogenen Wachstumsfaktoren, die in Osteoblasten exprimiert werden wie die alkalische Phosphatase, Osteopontin und Osteokalzin [102].

Des Weiteren haben Satomura et al. [107] gezeigt, dass Melatonin die Bildung der mineralisierten Matrix stimuliert. Sie konnten nachweisen, dass die alkalische Phosphatase-Aktivität von humanen Osteoblasten in vitro nach Gabe von Melatonin gesteigert war. Außerdem war die Genexpression von Typ-I-Kollagen, Osteopontin, Bone Sialoprotein (BSP) und Osteokalzin deutlich erhöht. Weiterhin konnten sie zeigen, dass humane Osteoblasten von jüngeren Individuen eine höhere Expression von Mel-1a-Rezeptoren haben als die von älteren Individuen. Darüber hinaus war nach intraperitonealer Gabe von Melatonin bei Mäusen das Volumen von neu gebildetem kortikalem Knochen im Bereich des Femur erhöht. Die Autoren postulieren daher, dass Melatonin zur Verbesserung der Knochenregeneration im Rahmen der Frakturheilung therapeutisch eingesetzt werden könnte [107]. In einer anderen Studie ergaben sich in vitro ähnliche Ergebnisse. So führte die Gabe von Melatonin zu einer verstärkten Osteoblasten-Differenzierung und Mineralisierung in präosteoblastischen MC3T3-E1-Zellen. Zudem wurde eine erhöhte Expression von Osteogenese-Markern wie Osteokalzin, BMP-2 (Bone Morphometric Protein) und BMP-4 beobachtet [89]. In der hier vorgelegten Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Osteoblasten in vivo innerhalb des Frakturkallus zur Expression von Melatonin-Rezeptoren in der Lage sind. Dies bestärkt die Rolle von Melatonin im Rahmen der Knochenregeneration.

Andere Studien haben untersucht, inwieweit Melatonin als freier Radikalfänger [99] die Frakturheilung beeinflusst. Bei der Knochenresorption wird durch Osteoklasten eine hohe Konzentration an Hyperoxid-Anionen erzeugt, die zum Abbauprozess

beitragen. Halici et al. [37] haben bei Melatonin-Behandlung von Ratten eine verminderte Konzentration von Plasma Malondialdehyd und eine Verringerung der Aktivität von Superoxiddismutase und Myeloperoxidase in verschiedenen Phasen der Frakturheilung beobachtet, wobei die Heilung unter Melatonin-Behandlung beschleunigt war. Zu beachten ist dabei, dass die Melatoninindosis bei Halici et al. mit 30 mg/kg/Tag deutlich geringer war als die Dosis von 50 mg/kg/Tag, die in dieser Arbeit gegeben wurde.

Eine Vielzahl von Studien untersucht zudem die Rolle von Melatonin bei der Osteoporose [105]. So wird zum Beispiel eine deutliche Abnahme der Melatonin-Sekretion während der Menopause [104] als wichtiger Faktor in der Entstehung der Osteoporose angesehen. Dies bestätigt sich auch in einer Studie an Ratten [115]. Dazu erhielten ovariectomized Ratten täglich 10 mg/kg bzw. 30 mg/kg Melatonin. Die trabekuläre Knochendicke und Knochenfläche in den Wirbelkörpern sowie der kortikale Knochen des Femur waren nach Ovariectomie primär deutlich vermindert. Nach der täglichen Behandlung mit Melatonin konnten die Autoren eine Zunahme der Knochenbildung verzeichnen [115].

In einer anderen Studie wurden Frauen im Alter von 52 bis 60 Jahren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei adipösen Frauen der nächtliche Melatoninspiegel gegenüber dem Melatoninspiegel am Tag nicht so stark differierte wie in einer normalgewichtigen Kontrollgruppe, während der Mittelwert des Melatoninspiegels bei beiden Gruppen etwa gleich war [82]. Ebenso zeigte der Spiegel verschiedener osteogener Marker bei den adipösen Frauen einen geringeren Tag-Nacht-Unterschied als bei der Kontrollgruppe. Die Autoren postulieren, dass eine starke zirkadiane Variation des Melatonin-Spiegels gewisse vorbeugende Wirkung gegen den postmenopausalen Knochenverlust hat. In einer weiteren Studie wurde nachgewiesen, dass bei perimenopausalen Frauen die nächtliche Gabe von Melatonin über 6 Monate zu einem signifikant verringerten Osteoklasten-zu Osteoblasten-Verhältnis führte als in der Vergleichsgruppe [55].

Im Gegensatz zu den bereits genannten Ergebnissen anderer Studien konnte in der hier vorgestellten Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Melatonin die Frakturheilung beeinträchtigt. Dies zeigte sich in einer verringerten Biegesteifigkeit der Knochen in der frühen Phase der Frakturheilung bei Melatonin-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem war die Osteoklastenaktivität durch Hemmung der RANKL-Expression vermindert, was sich auch in einer signifikant

geringeren Anzahl an TRAP-positiven Osteoklasten zeigte.

Vergleichbare Ergebnisse zeigte eine Studie von Koyama et al. [56]. Die Autoren untersuchten die Knochendichte, Knochenmasse und trabekuläre Knochendicke bei Mäusen unter einer täglichen Gabe von 1 mg/kg bzw. 5 mg/kg bzw. 50 mg/kg Melatonin. Nach vier Wochen waren bei den Tieren mit 5 mg/kg und 50 mg/kg alle drei Knochenparameter signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den Melatonin-behandelten Tieren wurde eine um 76% reduzierte Osteoklastendichte festgestellt, aber keine signifikante Erhöhung der alkalischen Phosphatase (ALP). Koyama et al. konnten damit zeigen, dass Melatonin nicht die Knochenbildung beeinflusst, sondern, vergleichbar mit unseren Ergebnissen, die Knochenresorption hemmt.

Auch andere Studien konnten nachweisen, dass die Behandlung mit Melatonin den Remodelingprozess verzögert. Zum Beispiel führte die Melatonin-Behandlung bei Ratten nach Ovariectomie [83] zu einer Abnahme der Knochenresorption. Ursache des verzögerten Remodelingsprozesses könnte sein, dass die Behandlung mit Melatonin nicht nur die RANKL-Expression signifikant vermindert, sondern auch die Anzahl der TRAP-positiven Osteoklasten signifikant reduziert.

Weiterhin haben Gerstenfeld et al. [33] nachgewiesen, dass die Inhibition von RANKL den Remodelingprozess während der Frakturheilung hemmt. Sie untersuchten die Wirkung eines RANKL-Inhibitors auf die Frakturheilung bei Mäusen. Sie konnten sowohl 21 als auch 42 Tage postoperativ noch einen erhöhten Anteil an nicht-resorbiertem Knorpelgewebe nachweisen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Obwohl die Resorption von Knorpel verzögert war, fanden die Autoren jedoch eine erhöhte Steifigkeit des Frakturkallus. Der Unterschied zu den hier vorliegenden Ergebnissen könnte daher kommen, dass Gerstenfeld et al. die biomechanischen Untersuchungen erst 21 bzw. 42 Tage postoperativ durchführten.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass eine verminderte RANKL-Expression die Frakturheilung beeinflusst. So haben Li et al. [61] in einem Frakturmodell der Ratte nach Orchidektomie die Knochendichte gemessen. Sie konnten nachweisen, dass nach Gabe von OPG (10mg/kg, zweimal wöchentlich subkutan) die Knochendichte signifikant höher war als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig war die RANKL-Konzentration signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Autoren schließen daraus, dass die Gabe von OPG die RANKL-Expression hemmt und damit dem Knochenabbau nach Orchidektomie entgegenwirkt.

Bragman et al. konnten in einer Untersuchung an Mäusen mit Osteogenesis imperfecta zeigen, dass die Inhibierung von RANKL durch RANK-Antikörper oder durch Alendronat (ALN) die Frakturhäufigkeit signifikant reduziert [6]. Die metaphysäre Knochendichte und die Trabekeldichte waren in beiden Gruppen erhöht. Im Rahmen der biomechanischen Testungen konnten jedoch keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen ermittelt werden.

Obwohl OPG im Rahmen des RANKL/RANK/OPG Systems als „Gegenspieler“ von RANKL fungiert, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von OPG durch die Behandlung mit Melatonin nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigen in vitro Studien von Koyama et al. [56], dass die Gabe von Melatonin die Expression von OPG erhöht. Insgesamt finden sich in der Literatur dazu kontroverse Aussagen. Einige Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte OPG-Expression mit einer verminderten Knochendichte einhergeht [1]. Andere Studien konnten jedoch keinen Zusammenhang nachweisen [1]. Kon et al. [53] untersuchten bei Mäusen die OPG-Expression in der frühen Phase der Frakturheilung und konnten zeigen, dass die maximale OPG-Expression 24 Stunden postoperativ sowie 7 Tage postoperativ nachweisbar war. Die RANKL-Expression war hingegen nach 3 und 14 Tagen postoperativ am höchsten. In unserer Studie wurden die Western blot- Untersuchungen nach 14 Tagen durchgeführt, so dass die Ergebnisse nicht uneingeschränkt verglichen werden können.

Der Einfluss von Melatonin auf die Osteoblastogenese wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung der Expression von Kollagen I untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression von Kollagen I bei den mit Melatonin behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert war. Dies steht im Widerspruch zu verschiedenen in vitro Studien. Nakade et al. [75] konnten nachweisen, dass Melatonin die Typ-I- Kollagen-Synthese in menschlichen Knochenzellen in vitro stimuliert. Sowohl Roth et al. [102] als auch Nakade et al. [75] berichteten, dass durch die Gabe von Melatonin die Proliferation, Differenzierung und Knochenbildung in vitro erhöht wird. Diese Ergebnisse deuten im Vergleich zu den in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnissen darauf hin, dass Melatonin in vivo keine osteogene Wirkung hat. So haben Suzuki et al. [112] ebenfalls gezeigt, dass Melatonin durch Hemmung der ALP-Aktivität die Osteoblasten-Aktivität hemmt.

Zusammenfassend kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit gesagt werden, dass Melatonin im Mausmodell die Frakturheilung nicht stimuliert. Vielmehr konnte

gezeigt werden, dass die Behandlung mit Melatonin die Frakturheilung beeinträchtigt, was sich in einer signifikant geringeren Biegesteifigkeit im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass Melatonin durch Hemmung der Expression von RANKL die Osteoklastenaktivität und damit die Knochenresorption inhibiert.





# Literaturverzeichnis

- [1] Abrahamsen, B., Hjelmborg, J., Kostenuik, P., Stilgren, L., Kyvik, K., Adamu, S., Brixen, K., & Langdal, B. (2005). Circulating amounts of osteoprotegerin and RANK ligand: Genetic influence and relationship with BMD assessed in female twins. *Bone*, 36, 727–735.
- [2] Amstrup, A., Sikjaer, T., Mosekilde, L., & Rejnmark, L. (2013). Melatonin and the skeleton. *Osteoporos Int*, May 29, Epub ahead of print.
- [3] Arendt, J. (2000). Melatonin, circadian rhythms and sleep. *New Engl J Med*, 343, 1114–1116.
- [4] Arendt, J., & Touitou, Y. (1993). Melatonin and the Pineal Gland: From Basic Science to Clinical Application. *Proceedings of the International Symposium on Melatonin and the Pineal Gland, Paris, 1992; Elsevier Science*.
- [5] Aubin, J., Liu, F., Malaval, L., & Gupta, A. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 17, 77–83.
- [6] Bargman, R., Posham, R., Boskey, A., DiCarlo, E., Raggio, C., & Pleshko, N. (2012). Comparable outcomes in fracture reduction and bone properties with rankl inhibition and alendronate treatment in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Osteoporos Int*, 23, 1141–1150.
- [7] Bartsch, C., Bartsch, H., Flüchter, S., Attanasio, A., & Gupta, D. (1985). Evidence for modulation of melatonin secretion in men with benign and malignant tumors of the prostate: relationship with the pituitary hormones. *J Pineal Res*, 2, 121–132.
- [8] Benninghoff, A., & Drenckhahn, D. (2008). Anatomie, Band 1. *Verlag Urban und Fischer*, 254–277.

- [9] Bergmann, P., Body, J., Boonen, S., Boutsen, Y., JP, D., Goemaere, S., Kaufman, J., Reginster, J., & Rozenberg, S. (2011). Loading and skeletal development and maintenance. *Journal of Osteoporosis*, Article ID 786752, 1-15.
- [10] Boecker, W., Denk, H., Heitz, P., & Moch, H. (2004). Pathologie. *Urban & Fischer bei Elsevier*, 509–510.
- [11] Bonnarens, F., & Einhorn, T. (1984). Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*, 2, 97–101.
- [12] Bourque, W., Gross, M., & Hall, B. (1992). A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci*, 42, 369–374.
- [13] Bubenik, G. (1998). *Biol Signals Recept*, 7, 195–219.
- [14] Bucher, O., & Wartenberg, H. (1997). Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12. Auflage, *Huber, Bern*, 129–140.
- [15] Burstein, A., & Frankel, V. (1971). A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech*, 4, 155–158.
- [16] Cagnacci, A., Elliott, J., & Yen, S. (1992). Melatonin: A major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 447–452.
- [17] Calvo-Guirado, J., Gomez-Moreno, G., Barone, A., Cutando, A., Alcaraz-Banos, M., Chiva, F., Lopez-Mari, L., & Guardia, J. (2009). Melatonin plus porcine bone on discrete calcium deposit implant surface stimulates osteointegration in dental implants. *J Pineal Res*, 47, 164–172.
- [18] Cheung, K., Kaluarachi, K., Andrew, G., Lu, W., Chan, D., & Cheah, K. (2003). An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res*, 21, 685–690.
- [19] Claes, L., Heigele, C., Neidlinger-Wilke, C., Kaspar, D., Seidl, W., Margevicius, K., & Augat, P. (1998). Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res*, 355 Suppl, 132–147.

- [20] Claes, L., Maurer-Klein, L., Henke, T., Gerngross, H., Melnyk, M., & Augat, P. (2006). Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res*, 24, 1178–1185.
- [21] Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L., Neufeld, G., & Levi, B. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 271, 736–741.
- [22] Descartes, R. (1649). Les passions de l'âme, articles 31 et 32. *Chez Henry Le Gras, Paris*, 45–48.
- [23] Dijk, D., Duffy, J., Riel, E., Shanahan, T., & Czeisler, A. (1999). Ageing and the circadian and homeostatic regulation of human sleep during forced desynchrony of rest, melatonin, and temperature rhythm. *J Physiol*, 516, 611–627.
- [24] Drago, F., & Busa, L. (2000). Acute low doses of melatonin restore full sexual activity in impotent male rats. *Brain Res*, 878, 98–104.
- [25] Eder, M., & Gedigk, P. H. (1990). Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie. 33. Auflage, Springer-Verlag, Kapitel 19: Bewegungsorgane.
- [26] Einhorn, T. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, 355 Suppl, 7–21.
- [27] Fleisch, H. (1997). Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis - an update. *Horm Metab Res*, 29, 145–150.
- [28] Friedman, R., An, Y., Ming, J., Draughn, R., & Bauer, T. (1996). Influence of biomaterial surface texture on bone ingrowth in the rabbit femur. *J Orthop Res*, 14, 455–464.
- [29] Frost, H. (1969). Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calc Tiss Res*, 3, 211–237.
- [30] Gao, W., Lin, M., Liang, A., Zhang, L., Chen, C., Liang, G., Xu, C., Peng, Y., Chen, C., Huang, D., & Su, P. (2013). Melatonin enhances chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Pineal Res*, Sep 30. doi: 10.1111/jpi.12098, Epub ahead of print .

- [31] Garcia, P., Holstein, J., Histing, T., Burkhardt, M., Culemann, U., Pizanis, A., Wirbel, R., Pohlemann, T., & Menger, M. (2008). A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: Impact of stability on fracture healing. *J Biomech*, 41, 1689–1696.
- [32] Gerstenfeld, L., Cullinane, D., Barnes, G., Graves, D., & Einhorn, T. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*, 88, 873–884.
- [33] Gerstenfeld, L., Sacks, D., Pelis, M., Mason, Z., Graves, D., Barrero, M., Ominsky, M., Kostenuik, P., Morgan, E., & Einhorn, T. (2009). Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *J Bone Miner Res*, 24, 196–208.
- [34] Gerstenfeld, L., Wronski, T., Hollinger, J., & Einhorn, T. (2005). Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res*, 20, 1715–1722.
- [35] Goldberg, V., Powell, A., & Shaffer, J. (1985). Bone grafting: Role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res*, 3, 389–404.
- [36] Green, E., Lubahn, J., & Evans, J. (2005). Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. *J Surg Orthop Adv*, 14, 64–72.
- [37] Halici, M., Öner, M., Güney, A., Canöz, O., Narin, F., & Halici, C. (2010). Melatonin promotes fracture healing in the rat model. *Joint Diseases and Related Surgery*, 21, 172–177.
- [38] Herxheimer, A., & Petrie, K. (2001). Melatonin for preventing and treating jet lag. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, CD001520.
- [39] Hiltunen, A., Aro, H., & Vuorio, E. (1993). Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res*, 297, 23–27.
- [40] Hiltunen, A., Vuorio, E., & Aro, H. (1993). A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res*, 11, 305–312.
- [41] Histing, T., Garcia, P., Holstein, J., Klein, M., Matthys, R., Nuetzi, R., Steck, R., Laschke, M., Wehner, T., Bindl, R., Recknagel, S., Stuermer, E., Vollmar,

- B., Wildemann, B., Lienau, J., Willie, B., Peters, A., Ignatius, A., Pohlemann, T., Claes, L., & Menger, M. (2011). Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*, 49, 591–599.
- [42] Histing, T., Garcia, P., Matthys, R., Leidinger, M., Holstein, J., Kristen, A., Pohlemann, T., & Menger, M. (2010). An internal locking plate to study intramembranous bone healing in a mouse femur fracture model. *J Orthop Res*, 28, 397–402.
- [43] Histing, T., Holstein, J., Garcia, P., Matthys, R., Kristen, A., Claes, L., Menger, M., & Pohlemann, T. (2009). Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *J Orthop Res*, 27, 1152–1156.
- [44] Histing, T., Marciniak, K., Scheuer, C., Garcia, P., Holstein, J., Klein, M., Matthys, R., Pohlemann, T., & Menger, M. (2011). Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res*, 29, 867–873.
- [45] Histing, T., Stenger, D., Kuntz, S., Scheuer, C., Tami, A., Garcia, P., Holstein, J., Klein, M., Pohlemann, T., & Menger, M. (2012). A new model to analyze metaphyseal bone healing in mice. *J Surg Res*, 178, 715–721.
- [46] Histing, T., Stenger, D., Scheuer, C., Metzger, W., Garcia, P., Holstein, J., Klein, M., Pohlemann, T., & Menger, M. (2012). Pantoprazole, a proton pump inhibitor, delays fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int*, 90, 507–514.
- [47] Holstein, J., Matthys, R., Histing, T., Becker, S., Fiedler, M., Garcia, P., Meier, C., Pohlemann, T., & Menger, M. (2009). Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res*, 153, 71–75.
- [48] Holstein, J., Menger, M., Culemann, U., Meier, C., & Pohlemann, T. (2007). Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech*, 40, 215–219.
- [49] Holstein, J., Menger, M., Scheuer, C., Meier, C., Culemann, U., Wirbel, R., Garcia, P., & Pohlemann, T. (2007). Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci*, 80, 893–900.

- [50] Jaworski, Z., & Lok, E. (1972). The Rate of Osteoclastic Bone Erosion in Haversian Remodeling Sites of Adult Dog's Rib. *Calcif Tiss Res*, 10, 103–112.
- [51] Junqueira, L., Carneiro, J., & Gratzl, M. (2005). Histologie. *Springer Lehrbuch*, Springer, Berlin, 81–105.
- [52] Kitay, J., & Altschule, M. (1954). The pineal gland. *Cambridge, MA, Harvard University Press*, 79–95.
- [53] Kon, T., Cho, T., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D., & Gerstenfeld, T., LC Einhorn (2001). Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF -kB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 16, 1004–1014.
- [54] Kostoglou-Athanassiou, I. (2013). Therapeutic applications of melatonin. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 4, 13–24.
- [55] Kotlarczyk, M., Lassila, H., O Neil, C., Damico, F., Enderby, L., Witt-Enderby, P., & Balk, J. (2012). Melatonin osteoporosis prevention study (mops): a randomized, double blind, placebo-controlled study examining the effects of melatonin on bone health and quality of life in perimenopausal women. *J Pineal Res*, 52, 414–426.
- [56] Koyama, H., Nakade, O., Takada, Y., Kaku, T., & Lau, K. (2002). Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res*, 17, 1219–1229.
- [57] Kragstrup, J., & Melsen, F. (1983). Three-dimensional morphology of trabecular bone osteons reconstructed from serial sections. *Metab Bone Dis Relat Res*, 5, 127–130.
- [58] Kunz, D. (2006). Melatonin und Schlaf-Wach Regulation; Habilitationsschrift. *Charite, FU Berlin, Deutschland*.
- [59] Lacey, D., Timms, E., Tan, M., HL Kelley, Dunstan, C., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., & Boyle, W. (1998). Osteoprotegerin

- ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165–176.
- [60] Lettin, A. (1965). The effects of axial compression on the healing of experimental fractures of the rabbit tibia. *Proc R Soc Med*, 58, 882–886.
- [61] Li, X., Ominsky, M., Stolina, M., Warmington, K., Geng, Z., Niu, Q., Asuncion, F., Tan, H., Grisanti, M., Dwyer, D., Adamu, S., Ke, H., Simonet, W., & Kostenuik, P. (2009). Increased RANK ligand in bone marrow of orchietomized rats and prevention of their bone loss by the RANK ligand inhibitor osteoprotegerin. *Bone*, 45, 669–676.
- [62] Liebmann, P., Wölfler, A., Felsner, P., Hofer, D., & Schauenstein, K. (1997). Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 112, 203–211.
- [63] Lippert, H. (2003). Lehrbuch Anatomie . 6. Auflage, Verlag Urban und Fischer, 32–41.
- [64] Liu, J., Huang, F., & He, H. (2013). Melatonin effects on hard tissues: bone and tooth. *Int J Mol Sci*, May 10;14(5):10063-74.
- [65] Lüllmann, R. (2009). Taschenbuch histologie. 3. Auflage, Thieme-Verlag, 137–158.
- [66] Maestroni, G. (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*, 14, 1–10.
- [67] Manassero, M., Viateau, V., Matthys, R., Deschepper, M., Vallefucio, R., Bensidhoum, M., & Petite, H. (2013). A novel murine femoral segmental critical-sized defect model stabilized by plate osteosynthesis for bone tissue engineering purposes. *Tissue Eng Part C Methods*, 19, 271–280.
- [68] Manigrasso, M., & O'Connor, J. (2004). Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma*, 18, 687–695.
- [69] Marks, S. (1983). The origin of osteoclasts: Evidence, clinical implications and investigative challenges of an extraskeletal source. *J Oral Pathol Med*, 12, 226–256.



- [70] Marsell, R., & Einhorn, T. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42, 551–555.
- [71] McKibbin, B. (1978). The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg*, 60, 150–162.
- [72] Meier, C., Liu, P., Handelsman, D., & Seibel, M. (2005). Endocrine regulation of bone turnover in men. *Clin Endocrinol*, 63, 603–616.
- [73] Munoz, F., Lopez-Pena, M., Mino, N., Gomez-Moreno, G., Guardia, J., & Cutando, A. (2012). Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs; Epub 2009. *Clin Implant Dent Relat Res*, 14, 226–235.
- [74] Murrills, R., Shane, E., Lindsay, R., & Dempster, D. (1989). Bone resorption by isolated human osteoclasts in vitro: effects of calcitonin. *J Bone Miner Res*, 4, 259–268.
- [75] Nakade, O., Koyama, H., Ariji, H., Yajima, A., & Kaku, T. (1999). Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res*, 27, 106–110.
- [76] Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., & Ono, K. (1994). Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 9, 651–659.
- [77] Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J., Lefoulon, F., Fauchere, J., Delagrang, P., Canet, E., & Boutin, J. (2000). Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, 275, 31311–31317.
- [78] Nunamaker, D. (1998). Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, 355, 56–65.
- [79] Nunamaker, D., & Perren, S. (1979). A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates. *Clin Orthop Relat Res*, 138, 167–174.
- [80] Olerud, S., & Danckwardt-Lillieström, G. (1968). Fracture healing in compression osteosynthesis in the dog. *J Bone Joint Surg Br*, 50, 844–851.

- [81] O'Loughlin, P. F., Morr, S., Bogunovic, L., Kim, A. D., Park, B., & Lane, J. M. (2008). Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am*, 90, 79–84.
- [82] Ostrowska, Z., Kos-Kudla, B., Marek, B., Swietochowska, E., & Gorski, J. (2001). Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. *Neuro Endocrinol Lett*, 22, 121–127.
- [83] Ostrowska, Z., Kos-Kudla, B., Swietochowska, E., Marek, B., Kajdaniuk, D., & Gorski, J. (2001). Assessment of the relationship between dynamic pattern of nighttime levels of melatonin and chosen biochemical markers of bone metabolism in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Neuro Endocrinol Lett*, 22, 129–136.
- [84] Parfitt, A. (1983). The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation. CRC Florida*, 143–223.
- [85] Parfitt, A. (2002). Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*, 30, 5–7.
- [86] Parfitt, A., & Chir, B. (1977). The cellular basis of bone turnover and bone loss. *Clin Orthop Rel Res*, 127, 236–247.
- [87] Parfitt, A., Drezner, M., Glorieux, F., Kanis, J., Malluche, H., Meunier, P., Ott, S., & Recker, R. (1987). Bone histomorphometry: standardisation of nomenclature, symbols and units. *J Bone Miner Res*, 2, 595–610.
- [88] Parfitt, A., Mundy, G., Roodman, G., Hughes, D., & Boyce, B. (1996). A new model for the regulation of bone resorption with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res*, 11, 150–159.
- [89] Park, K., Kang, J., Lee, E., Kim, J., Rhee, Y., Kim, M., Jeong, S., Park, Y., & Kim, S. (2011). Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the bmp/erk/wnt signaling pathways. *J Pineal Res*, 51, 187–194.
- [90] Perren, S. (1992). Biomechanische Grundlagen der Frakturbehandlung. *Orthopäde*, 21, 3–10.

- [91] Perren, S., & Rahn, B. (1980). Biomechanics of fracture healing (Review). *Can J Surg*, 23, 228–232.
- [92] Pharmainformation (2009). *Unabhängige Information für Ärzte, Jahrgang 24/ Nr. 4*.
- [93] Pierpaoli, W., & Maestroni, G. (1987). Melatonin: a principal neuroimmuno-regulatory and anti-stress hormone: its anti-aging effects. *Immunol Lett*, 16, 355.
- [94] Poeggeler, B., Reiter, R., Tan, D., Chen, L., & Manchester, L. (1993). Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res*, 14, 151–68.
- [95] Ramirez-Fernandez, M., Calvo-Guirado, J., Sánchez de Val, J., Delgado-Ruiz, R., Negri, B., Pardo-Zamora, G., Peñarrocha, D., Barona, C., Granero, J., & Alcaraz-Baños, M. (2013). Melatonin promotes angiogenesis during repair of bone defects: a radiological and histomorphometric study in rabbit tibiae. *Clin Oral Investig*, 17, 147–158.
- [96] Redman, J. (1997). Circadian entrainment and phase shifting in mammals with melatonin. *J Biol Rhythms*, 12, 581–587.
- [97] Reiter, R., & Robinson, J. (1995). Melatonin. *Bantam Books*.
- [98] Reiter, R., Tan, D., Manchester, L., Paredes, S., Mayo, J., & Sainz, R. (2009). Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod*, 81, 445–456.
- [99] Reiter, R., Tan, D., Manchester, L., & Qi, W. (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: A review of the evidence. *Cell Biochem Biophys*, 34, 237–256.
- [100] Röntgen, V., Blakytyn, R., Matthys, R., Landauer, M., Wehner, T., Göckelmann, M., Jermendy, P., Amling, M., Schinke, T., Claes, L., & Ignatius, A. (2010). Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res*, 28, 1456–1462.
- [101] Rossant, J., & Nagy, A. (1995). Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med*, 1, 592–594.

- [102] Roth, J., Kim, B., Lin, W., & Cho, M. (1999). Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem*, 274, 22041–22047.
- [103] Rueter, A., Trentz, O., & Wagner, M. (2004). Unfallchirurgie. 2. Auflage, Urban & Fischer bei Elsevier, 147–153.
- [104] Sack, R., Lewy, A., Erb, D., Vollmer, W., & Singer, C. (1986). Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res*, 3, 379–388.
- [105] Sanchez-Barcelo, E., Mediavilla, M., Tan, D., & Reiter, R. (2010). Scientific basis for the potential use of melatonin in bone diseases: Osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. *Journal of Osteoporosis*, Article ID 830231, 1–10.
- [106] Sandyk, R. (1990). Possible role of pineal melatonin in the mechanisms of aging. *Int J Neurosci*, 52, 85–92.
- [107] Satomura, K., Tobiume, S., Tokuyama, R., Yamasaki, Y., Kudoh, K., Maeda, E., & Nagayama, M. (2007). Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res*, 42, 231–239.
- [108] Schiebler, T., & Schmidt, W. (2003). Anatomie. 8. Auflage, Springer, Berlin, 133–137.
- [109] Schoen, M., Rotter, R., Schattner, S., Mittlmeier, T., Claes, L., Vollmar, B., & Gradl, G. (2008). Introduction of a new interlocked intramedullary nailing device for stabilization of critically sized femoral defects in the rat: A combined biomechanical and animal experimental study. *J Orthop Res*, 26, 184–189.
- [110] Scrinivasan, V., Pandi-Perumal, S., Traht, I., Spence, D., Poeggeler, B., Hardeband, R., & Cardinali, D. (2009). Melatonin and melatonergic drugs on sleep: possible mechanisms of action. *Int J Neurosci*, 119, 821–846.
- [111] Suda, T., Takahashi, N., & Martin, T. (1992). Modulation of Osteoclast Differentiation: Update 1995. *Endocrin Rev*, 13, 66–80.
- [112] Suzuki, N., & Hattori, A. (2002). Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J Pineal Res*, 33, 253–258.

- [113] Tan, D., Chen, L., Poeggeler, B., Manchester, L., & Reiter, R. (1993). Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*, 1, 57–60.
- [114] University of New England (<http://faculty.une.edu/com/abell/histo/histolab3.htm>). Onlinekurs Histologie. *Biddeford and Portland, USA*.
- [115] Uslu, S., Uysal, A., Oktem, G., Yurtseven, M., Tanyalcin, T., & Basdemir, G. (2007). Constructive effect of exogenous melatonin against osteoporosis after ovariectomy in rats. *Anal Quant Cytol Histol*, 29, 317–325.
- [116] Waldhauser, F., Saletu, B., & Trinchard-Lugan, I. (1990). Sleep laboratory investigations on hypnotic properties of melatonin. *Psychopharmacology*, 100, 222–226.
- [117] Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Tatzer, E., Gisinger, B., Waldhauser, M., Schemper, M., & Frisch, H. (1988). Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 66, 648–652.
- [118] Wan, M., Shi, X., Feng, X., & Cao, X. (2001). Transcriptional mechanism of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem*, 276, 10119–10125.
- [119] Webb, S., & Pulg-Domingo, M. (1995). Role of Melatonin in health and disease. *Clin Endocrinol*, 42, 221–234.
- [120] Wildemann, B., Schmidmaier, G., Ordel, S., Stange, R., Haas, N., & Raschke, M. (2003). Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied ogf-i and tgf-beta 1: comparison of two proliferation markers, pcna and brdu. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 65, 150–156.
- [121] Witt-Enderby, P., Bennett, J., Jarzynkaa, M., Firestinea, S., & Melan, M. (2003). Melatonin receptors and their regulation. *Life Sci*, 72, 2183–2198.
- [122] Yamada, H., & Evans, F. (1970). Strength of biological materials. *The William and Wilkens Company,, Baltimore, USA*, 86–87.
- [123] Yang, X., Ricciardi, B., Hernandez-Soria, A., Shi, Y., Camacho, N., & Bostrom, M. (2007). Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*, 41, 928–936.

---

## Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
%	Prozent
A	Ampere
AANAT	Serotonin N-Acetyltransferase
AC	Adenylatcyclase
ALP	alkalische Phosphatase
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
ATP	Adenosintriphosphat
BDm	Bone Diameter
BMD	bone mineral density
BRU	bone remodeling unit
BSP	bone sialoprotein
BW	Body Weight
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDm	Callus diameter
CgAr	Cartilage Area
CAr	Total callus area
cm	Zentimeter
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	und andere (et alii)
FTAr	Fibrous Tissue Area
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GTP	Guanosintriphosphat
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
M	Mol
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulation Factor

---

Mel-1A-R	Melatoninrezeptor 1A
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MT1	Melatoninrezeptor 1
MT2	Melatoninrezeptor 2
MT3	Melatoninrezeptor 3
N	Newton (Kraft)
N/mm	Newton pro Millimeter
NaN3	Natriumazid
OD	Optische Dichte
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
pg	picogramm
pH	pH-Wert
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	parathyroid hormone
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand
RIS	Research Implant System
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TOTAr	Total Osseous Tissue Area
TRAP	Tartrate Resistent Acid Phosphatase
VEGF	vascular endothelial growth factor
vol	Volumen

# Abbildungsverzeichnis

2.1	<i>Knochenstruktur (Quelle: M. Trebsdorf: Biologie, Anatomie, Physiologie. Lau-Verlag, Reinbek (2000))</i> . . . . .	6
2.2	<i>Knochengewebe (Quelle: [114])</i> . . . . .	10
2.3	<i>Schema der Zellentwicklung; OC: Osteozyt; OB: Osteoblast; OCL: Osteoklast; Pre-OB: Preosteoblast; Pre-OCL: Preosteoklast; PG's: Prostaglandin (E2 and I); RANK-L: Receptor Activator Nuclear Factor- <math>\kappa</math>B Ligand; OPG: Osteoprotegerin; IGF: Insulin-like Growth Factor; TGF: Transforming Growth Factor; Scl: Sclerostin; PTHrP: Parathyroid Hormone Related Peptide; (Quelle: [9])</i> . . . . .	11
2.4	<i>Kallusbildung: Humanes Präparat eines Femurschaftes mit Ausbildung eines Frakturkallus (Bild: Prof. Uehlinger, Universitätsklinik des Saarlandes, [25])</i> . . . . .	15
2.5	<i>Frakturheilungsphasen beim Menschen: a) Hämatom und Entzündungsphase, b) Granulationsphase (weicher Kallus) , c) Phase der Kallushärtung, d) Phase des Umbaus (Modeling und Remodeling); (Quelle: [114])</i> . . . . .	17
2.6	<i>Häufigkeit des Einsatzes verschiedener Tiermodelle zur Untersuchung der Frakturheilung (Quelle: [81])</i> . . . . .	19
2.7	<i>Zahl der Publikationen pro Jahr im Zeitraum 1960 bis 2010 mit folgenden Suchbegriffen: bone repair and rats (gestrichelte schwarze Kurve), bone repair and mice (schwarze Kurve), fracture healing and rats (gestrichelte graue Kurve), fracture healing and mice (graue Kurve). (Quelle: [41])</i> . . . . .	21
2.8	<i>Strukturformel des Melatonins (<math>C_{13}H_{16}N_2O_2</math>)</i> . . . . .	23



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

2.9	<i>Biosynthese des Melatonins; TRP-H: Tryptophan-Hydroxylase, OH-TRP-DC: 5-Hydroxy-Tryptophan-Decarboxylase, S-N-AT: Serotonin-N-Acetyl-Transferase (AA-NAT), AS-O-MT: Acetyl-Serotonin-O-Methyl-Transferase (Quelle: pharmexplorer.at)</i>	24
2.10	<i>Schematische Darstellung der Insekretion von Melatonin; SCN= suprachiasmatischer Nucleus (Quelle: A.Zverev, EGBs e-Learning, Denver, USA )</i>	25
2.11	<i>Melatoninrezeptoren im Gehirn; (Quelle: A.Zverev, EGBs e-Learning, Denver, USA )</i>	26
4.1	<i>oben: Führungsdraht aus Wolfram; unten: Schraubendreher mit eingespannter Schraube</i>	33
4.2	<i>Hautschnitt über der Patella</i>	35
4.3	<i>Eröffnen des Markraums mit der Kanüle</i>	35
4.4	<i>Kanüle vor Einbringen des Führungsdrahtes</i>	36
4.5	<i>Einliegender Führungsdraht nach Entfernen der Kanüle</i>	36
4.6	<i>Guillotine zur Frakturierung des Femur</i>	37
4.7	<i>Platzierung des Femur unter der Guillotine</i>	37
4.8	<i>Radiologische Kontrolle der Frakturkonfiguration</i>	38
4.9	<i>Eindrehen der Schraube</i>	38
4.10	<i>Sicht auf die Fossa intercondylaris nach Abbrechen der Schraube an der Sollbruchstelle</i>	39
4.11	<i>Radiologische Kontrolle der Implantatlage</i>	39
4.12	<i>Naht der Kniegelenkscapsel</i>	40
4.13	<i>Adaptation der Haut</i>	40
4.14	<i>Röntgenaufnahme des frakturierten rechten Femur (mit Schraube) vor Ausbau des Knochens (A), nach Ausbau des Knochens (beide Femora) (B) und nach Entnahme der Schraube (C) zwei Wochen nach Fraktur</i>	42

4.15	Röntgenaufnahme des frakturierten rechten Femur (mit Schraube) vor Ausbau des Knochens (A), nach Ausbau des Knochens (beide Femora) (B) und nach Entnahme der Schraube (C) fünf Wochen nach Fraktur . . . . .	42
4.16	Apparatur zur 3-Punkt-Biegetestung (Mini-Zwick Z 2.5, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) . . . . .	44
4.17	Skizze eines Kraft-Weg-Diagramms einer Biegetestung mit eingezeichneter Steigung zur Bestimmung der Steifigkeit . . . . .	45
4.18	Schematische Darstellung der definierten high power fields . . . . .	48
5.1	Röntgenbilder des frakturierten und des gesunden Femur eines Tieres der Kontrollgruppe zwei Wochen postoperativ (A), der Melatoningruppe zwei Wochen postoperativ (B), der Kontrollgruppe fünf Wochen postoperativ (C) und der Melatoningruppe fünf Wochen postoperativ (D). Die Frakturen nach zwei Wochen zeigten eine partielle knöcherne Überbauung (Goldberg-Score = 1), nach fünf Wochen eine vollständige knöcherne Überbauung (Goldberg-Score = 2) . . . . .	52
5.2	Goldberg-Score zur radiologischen Beurteilung der Frakturheilung der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ : 0 = keine knöcherne Überbrückung, 1 = partielle knöcherne Überbrückung, 2 = komplette knöcherne Überbrückung; Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM . . . . .	53
5.3	Absolute Biegesteifigkeit der Knochen der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM; * $p < 0,05$ relativ zur Kontrollgruppe . . . . .	54
5.4	Relative Biegesteifigkeit der Knochen der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM; * $p < 0,05$ relativ zur Kontrollgruppe . . . . .	54
5.5	Histomorphometrische Analyse der Gesamt-Kallusfläche (CAr) im Verhältnis zum Durchmesser des Femur (BDm) in mm der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM; * $p < 0,05$ relativ zur Kontrollgruppe . . . . .	56

5.6	<i>Gewebezusammensetzung des Frakturspaltes der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Beide Cortices wurden folgendermaßen bewertet: 0 Punkte: bindegewebige Überbrückung, 1 Punkt: knorpelige Überbrückung, 2 Punkte: knöcherne Überbrückung. Es wurde die Summe für beide Cortices betrachtet (maximal 4 Punkte). Angegeben sind Mittelwert <math>\pm</math> SEM . . . . .</i>	57
5.7	<i>Anteil an Knochengewebe im Kallus relativ zur Gesamt-Kallusfläche der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert <math>\pm</math> SEM . . .</i>	57
5.8	<i>Anteil an Bindegewebe im Kallus relativ zur Gesamt-Kallusfläche der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert <math>\pm</math> SEM . . .</i>	58
5.9	<i>Anteil an Knorpelgewebe im Kallus relativ zur Gesamt-Kallusfläche der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen und fünf Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert <math>\pm</math> SEM . . .</i>	58
5.10	<i>Anzahl der TRAP-positiven Zellen pro HPF (High Power Field ; vgl. Abschnitt 4.2.3) im Frakturkallus der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert <math>\pm</math> SEM; * <math>p &lt; 0,05</math> versus der Kontrollgruppe . . . . .</i>	59
5.11	<i>Immunhistochemische Färbung TRAP-positiver Zellen (A), sowie Mel 1aR Expression (B) innerhalb des Frakturkallus zwei Wochen postoperativ . . . . .</i>	60
5.12	<i>Western Blot Analyse von OPG, RANKL, Kollagen I und PCNA im Kallusgewebe. <math>\beta</math>-Aktin dient der densitometrischen Normierung . . . . .</i>	61
5.13	<i>Western Blot Analyse von OPG, RANKL, Kollagen I und PCNA im Kallusgewebe der Tiere der Kontrollgruppe (weiße Balken) und der Melatoningruppe (schwarze Balken) zwei Wochen postoperativ. Angegeben sind Mittelwert <math>\pm</math> SEM ; * <math>p &lt; 0,05</math> versus der Kontrollgruppe . . . . .</i>	62

# Tabellenverzeichnis

4.1	<i>Anzahl der Versuchstiere für die verschiedenen Untersuchungen. Die radiologischen, biomechanischen und histomorphometrischen Untersuchungen wurden jeweils am selben Tier durchgeführt.</i>	32
4.2	<i>Analysierte Proteine</i>	49



---

## Publikation

Die wissenschaftlichen Inhalte dieser Arbeit wurden in einem Fachjournal publiziert und auf einem internationalen Kongress vorgestellt:

### Publikation

Histing, T., Anton, C., Scheuer, C., Garcia, P., Holstein, J., Klein, M., Matthys, R., Pohlemann, T., and Menger, M.D. (2012). Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. *Journal of Surgical Research*, 173, 83-90

### Vortrag

Histing, T., Anton, C., Scheuer, C., Garcia, P., Holstein, J., Klein, M., Matthys, R., Pohlemann, T., Menger, M.D.: Melatonin impairs fracture healing by suppressing RANKL-mediated bone remodeling. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 13.-16.01.2011, Long Beach, California, USA.

---

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen Dank sagen, die mich im Rahmen meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Meiner Doktermutter und Betreuerin PD Dr. Tina Histing gilt mein besonderer Dank. Sie hat mir die Grundlagen des experimentellen Arbeitens vermittelt und ihre souveräne Leitung des Forschungsvorhabens hat mir in allen Phasen des Projektes sehr geholfen. Ich danke ihr für ihre umfangreiche Unterstützung.

Für die großzügige Hilfsbereitschaft und die exzellente Infrastruktur möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Menger und Prof. Dr. Tim Polemann bedanken.

Für die histologische und biochemische Probenaufbereitung möchte ich Claudia Scheuer und Janine Becker meinen Dank sagen.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für das freundliche Arbeitsklima und die hilfreiche Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle Unterstützung.



---

---

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Christina Gisela Anton
Geburtsdatum	21.6.1983
Geburtsort	Bonn

### Schulausbildung

1994 – 1995	Besuch des Carl-von-Ossietzky-Gymnasiums in Bonn
1995 – 2003	Besuch des Marie-Therese-Gymnasiums in Erlangen (Abitur)

### Studium

WS 2003/04	Medizinstudium an der Semmelweis-Universität in Budapest
2004-2010	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes in Homburg
2009-2010	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Homburg/Saar in den Bereichen Allgemein-/Gefäßchirurgie, Unfall- und Herz-Thoraxchirurgie, Gastroenterologie und Radiologie
15.11.2010	Approbation

### Anstellungen

1.1.-31.12.2011	Anstellung als Assistentärztin am Universitätsklinikum des Saarlandes in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
1.1.2012-15.9.2013	Anstellung als Assistentärztin am Caritasklinikum Saarbrücken in der Klinik für Gefäßchirurgie
seit 16.9.2013	Anstellung als Assistenzärztin am Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde